



**INFEÇÃO DE CULTURAS PRIMÁRIAS DE MONÓCITOS
HUMANOS COM A BACTÉRIA *Legionella pneumophila***

ANA CATARINA RAMOS BATISTA ANTÃO

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MICROBIOLOGIA MÉDICA**

JUNHO 2016



Infeção de culturas primárias de monócitos humanos com a bactéria *Legionella pneumophila*

Ana Catarina Ramos Batista Antão

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Médica

Orientadora: Professora Doutora Maria Teresa Marques

Co-Orientadora: Doutora Zélia Silva

Co-orientadora: Mestre Maria de Jesus Chasqueira

Unidade de Infeção: etiologia, patogénese, e bases terapêuticas da NOVA Medical School/Faculdade de Ciências Médicas de Lisboa

JUNHO 2016

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Universidade Nova de Lisboa e à Coordenação deste Mestrado em Microbiologia Médica por me ter concedido a oportunidade de realizar o Mestrado nesta faculdade ao longo destes dois anos. Gostaria de agradecer ao Professor Doutor João Piedade por ter-se demonstrado bastante prestável e auxiliar na resolução de problemas que tivessem surgido ao longo deste longo caminho.

Gostaria de agradecer à Professora Doutora Maria Teresa Marques, pela sua orientação e pela oportunidade de realizar esta Tese na Faculdade de Ciências Médicas e pela disponibilidade demonstrada ao longo deste percurso.

Quero manifestar também os meus profundos agradecimentos à minha co-orientadora a Mestre Maria de Jesus Chasqueira, que me apoiou muito ao longo deste ano. As suas palavras de incentivo quando necessário, as críticas construtivas e a transmissão do seu conhecimento e experiência foram cruciais para que a realização desta tese fosse possível.

Quero também agradecer à Doutora Zélia Silva, minha co-orientadora neste trabalho, por se ter demonstrado sempre disponível para ajudar em qualquer situação que fosse necessária e também à Mestre Graça Marques por todo o apoio que disponibilizou.

Gostaria de agradecer também à Técnica Lúcia Rodrigues por toda a ajuda durante a realização deste trabalho e a todas as pessoas que trabalham no Laboratório de Microbiologia que de alguma forma contribuíram para uma melhor adaptação.

Gostaria de agradecer aos meus colegas, que realizaram também esta tese no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas, à Fátima, ao Fábio, à Joana, à Catarina e à Vera. Os momentos de boa disposição, as palavras de incentivo, e a amizade que partilhamos foram sem dúvida muito importantes proporcionando um ambiente de trabalho bastante bom. Estamos juntos!

Por último gostaria de deixar um agradecimento especial à minha família e amigos, em especial aos meus PAIS, ao Nico pela sua amizade e apoio constante, e ao Diogo que me deu sempre a sua força, e me fez acreditar que a realização desta Tese seria possível com esforço e dedicação.

Resumo

Legionella pneumophila é um bacilo gram-negativo capaz de invadir e de se multiplicar em células eucariotas, incluindo monócitos humanos e células epiteliais.

Legionella pneumophila tem a capacidade de manipular os processos celulares sendo este, um dos mecanismos chave que a bactéria utiliza para proliferar dentro do hospedeiro.

A infecção por *Legionella* pode apresentar-se sob duas formas clinicamente distintas, a Doença dos Legionários, causando uma pneumonia grave e a Febre de Pontiac, uma infecção brônquica autolimitada.

As fases do ciclo de vida da bactéria e os fatores que promovem a sua replicação dentro da célula fagocítica e a sua transmissão para um novo hospedeiro têm sido objecto de numerosos estudos utilizando diferentes espécies de amibas e linhas contínuas, no entanto, em células monocíticas primárias são poucos os estudos realizados.

O principal objectivo deste trabalho foi estudar o processo de replicação da *Legionella pneumophila* em linhas primárias de monócitos (obtidos partir de sangue periférico doado voluntariamente) e em macrófagos (obtidos por diferenciação de culturas primárias de monócitos humanos).

Para se obter uma cultura primária é necessário obter uma grande quantidade de células polimorfonucleares de sangue periférico, sendo que cada isolamento é influenciado pela idade e sexo do dador. Após a infecção das linhas primárias de monócitos e macrófagos com *Legionella pneumophila*, verificou-se alterações na morfologia das células infetadas. Esta observação foi numa primeira fase corroborada pela quantificação das bactérias às 24h, isto é, a comparação dos valores obtidos no plaqueamento do sobrenadante e do lisado da monocamada apontavam para existência de fagocitose. No entanto, ao comparar o crescimento da bactéria às 24h e 48h depois da infecção, verifica-se que não existiu multiplicação intracelular.

Abstract

Legionella pneumophila is a gram-negative bacillus that can invade and multiply in eukaryotic cells, including human monocytes and epithelial cells.

Legionella pneumophila has the ability to manipulate cellular processes, with this being one of the key mechanisms that the bacteria utilizes to proliferate within the host.

Infection by *Legionella* may present itself clinically in two different ways, Legionnaires' disease, causing severe pneumonia and Pontiac fever, or by a self-limiting bronchial infection.

The phases of the bacterial life cycle and the factors that promote replication within the phagocytic cell and its transmission to a new host have been the subject of numerous studies using different species of amoebae and continuous lines, however, there are few studies on primary monocytic.

The main objective of this work was to study the process of replication of *Legionella pneumophila* in primary monocyte lines (obtained from peripheral blood donated voluntarily) and macrophages (obtained by differentiation of primary cultures of human monocytes).

To obtain a primary culture it is required to obtain a large amount of peripheral blood polymorphonuclear cells, with each isolation being influenced by the age and gender of the donor. After the infection of primary monocytes and macrophage lines with *Legionella pneumophila*, changes were observed in the morphology of infected cells.

This observation was initially confirmed by the quantification of bacteria at 24h, that is, the comparison of the values obtained in the plating of the supernatant the lysate from the monolayer pointed to phagocytosis. However, comparing the growth of bacteria at 24h and 48h after infection, it appears that there was no intracellular multiplication.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract.....	iii
Índice	iv
Índice de tabelas.....	viii
Lista de abreviaturas e símbolos	ix
1. Introdução	1
1.1. Enquadramento histórico.....	1
1.2. Bactéria do género <i>Legionella</i>	2
1.2.1. Taxonomia e filogenia	2
1.2.2. Morfologia e características gerais da bactéria	3
1.2.3. Epidemiologia.....	4
1.3. Patógenese.....	6
1.3.1. O Ciclo intracelular	6
1.4. Manifestações Clínicas.....	8
1.5. Diagnóstico Laboratorial.....	9
1.5.1. Isolamento da bactéria	9
1.5.2. Deteção de anticorpos.....	10
1.5.3. Deteção do antígeno urinário	11
1.5.4. Deteção de DNA.....	12
1.6. Terapêutica	13
1.7. Hospedeiros acidentais de <i>Legionella</i>	14
1.7.1. Monócitos e macrófagos.....	14
1.8. Cultura de células.....	16
1.8.1. Culturas Primárias	16
1.8.2. Culturas contínuas	17
1.8.3. Requerimentos da cultura celular	17
1.8.4. Isolamento de culturas primárias.....	18
1.8.4.1. Isolamento baseado na densidade celular	19
1.8.4.2. Adesão celular.....	20
1.8.4.3. Magnetic-activated cell sorting (MACS).....	21
1.9. Linhas celulares monocíticas.....	22
1.10. Objetivos do estudo	23
2. Material e Métodos	25

2.1. Culturas primárias.....	25
2.1.1. Isolamento de células mononucleares de sangue periférico	25
2.1.2. Congelação e descongelação de células mononucleares de sangue periférico	27
2.1.3. Adesão de monócitos.....	28
2.2. Isolamento de monócitos usando o <i>kit</i> de selecção positiva “CD14 <i>MicroBeads</i>” (Miltenyi).....	28
2.2.1. Diferenciação de monócitos em macrófagos	29
2.3 Estudos de viabilidade celular.....	30
2.4. Culturas.....	30
2.4.1. Cultura de monócitos e macrófagos	30
2.4.2. Cultura bacteriana.....	30
2.4.2. Cultura líquida	31
2.5. Procedimento de Infecção	32
2.5.1. Contagem de células (Câmara de <i>Neubauer</i>)	32
2.5.2. Infecção de monócitos e macrófagos	33
2.5.3. Quantificação de <i>Legionella pneumophila</i> Paris intra e extracelular	33
3.Resultados e Discussão	35
3.1. Isolamento e quantificação de células mononucleares de sangue periférico	35
3.1.1. Adesão e cultura de monócitos.....	38
3.1.2. Isolamento de monócitos usando o <i>kit</i> de selecção positiva “CD14 <i>MicroBeads</i> ” (Miltenyi)	40
3.2. Diferenciação de monócitos em macrófagos	41
3.3. Congelação de células mononucleares do sangue periférico	42
3.4.Cultura de <i>Legionella pneumophila</i> Paris	43
3.5. Infecção em monócitos e macrófagos	44
3.6. Quantificação de bactérias intra e extracelulares	46
4. Conclusões	49
5. Referências Bibliográficas.....	53
Anexo I	64
Anexo II.....	65
Anexo III	66
Anexo IV	67
Anexo V	68

Índice de figuras

Figura 1- (1) Disseminação da bactéria <i>Legionella</i> a partir de fontes de água doce, (2) que é distribuída em baixas concentrações, (3) que vai colonizar redes de canalização predial e sistemas de refrigeração, (4) que aplicam o inóculo sob condições ambientais favoráveis, (5) subsequente aerossolização de água contaminada e exposição do Homem.....	6
Figura 2- <i>Lp</i> modula o tráfico do vacúolo estabelecendo um nicho replicativo.....	7
Figura 3- (6) A população exposta inclui indivíduos com susceptibilidade elevada e indivíduos sem susceptibilidade (7a) os indivíduos suscetíveis devido à idade ou condições médicas subjacentes são os que apresentam um maior risco de desenvolver DL (7b) ambos os grupos estão em risco de contrair a Febre de Pontiac. (7c) existem indivíduos que podem contactar com a bactéria permanecendo assintomáticos	9
Figura 4 - Imagem de colónia de <i>Legionella</i> obtida durante o trabalho experimental ..	10
Figura 5 – Tipos de amostras e métodos de diagnóstico para determinação de uma potencial infeção por <i>Legionella</i> . Algumas técnicas são aplicáveis a mais do que um tipo de amostras.. Em geral, o sucesso da deteção de <i>Legionella</i> depende da severidade da doença, integridade da amostra, eficiência do laboratório e em particular das características do teste	13
Figura 6- Esquema representativo dos diferentes tipos de leucócitos e moléculas expressas na sua superfície	16
Figura 7- Esquema representativo do isolamento de células por gradiente de densidade.....	20
Figura 8 - Esquema de isolamento de células pela adesão ao plástico. (a) O tecido é fragmentado numa suspensão de células por meios mecânicos ou enzimáticos ou combinação de ambos (separações de sangue e aspirados de medula óssea não requerem esta etapa) (b) As células são filtradas de modo a remover aglomerados (c) Suspensão com um único tipo de células (d) Junção a uma superfície aderente (e) Após período de cultura observam-se a adesão das células alvo	21
Figura 9 - Esquema representativo de uma separação magnética (MACS) (1) Colocação da coluna de separação num campo magnético e adição da suspensão de células	

marcadas (2) Rejeição das células não marcadas (3) Remoção do campo magnético e eluição das células marcadas (células alvo)	22
Figura 10 - Esquema do isolamento de PBMC's realizado durante o trabalho experimental.....	25
Figura 11 - Câmara de <i>Neubauer</i> utilizada para efetuar a contagem de células.....	32
Figura 12 - (A) Anel de leucócitos obtidos após a 1ª centrifugação (B) Anel de PBMC's obtido após a 2ª centrifugação	35
Figura 13 - PBMCs, em câmara de <i>Neubauer</i> ,	37
Figura 14 - PBMC's em cultura, observação ao microscópio de fundo invertido	39
Figura 15 - Monócitos em cultura após adesão ao fundo da placa	39
Figura 16 - (A) Monócitos após adesão (1º dia de diferenciação). (B) Macrófagos após 7 dias de diferenciação com GM-CSF	41
Figura 17 - Exemplo de uma curva de de <i>Lp</i> Paris em AYE.....	44
Figura 18 - Morfologia de monócitos humanos em RPMI observada em microscópio invertido(40x).	46
Figure 19 - (A) Plaqueamento de <i>Lp</i> às 24h e (B)48h após infecção da linha primárias de monocitos. (C) Observação de crescimento de colônias de <i>Lp</i> Paris em meio BCYE cerca de 5 dias após o plaqueamento..	47

Índice de tabelas

Tabela 1 - Caraterização dos dadores e tipos de sangue utilizados no isolamento de células mononucleares de sangue periférico e respectivos rendimentos.	36
Tabela 2 - Número de dadores isolados por grupo sanguíneo	38
Tabela 3 - Contagem de células obtidas por adesão e pelo kit “CD14 <i>Microbeads</i> ”	40
Tabela 4 - Contagem de PBMC's antes e após descongelação	42
Tabela 5 - Exemplo de leituras de <i>Lp</i> Paris a uma OD _{550 nm} em meio AYE.....	43
Tabela 6 - Contagem de <i>Lp</i> Paris (UFC's/ ml) obtidas a partir do monocamada de monócitos após 24h e 48h após infeção (bactérias intracelulares). Resultado de 3 réplicas biológicas.....	48
Tabela 7 - Exemplo de uma contagem de <i>Lp</i> Paris (UFC's/ml) obtidas a partir do sobrenadante de uma infeção de monócitos (bactérias extracelulares) às 24h e 48h após infeção. Resultado de 3 réplicas biológicas.	48

Lista de abreviaturas e símbolos

BCYE	Meio tamponado com extracto de levedura e carvão do inglês <i>Buffered charcoal yeast extract</i>
°C	Grau Celcius
CDC	Centro de Controlo e Prevenção de Doenças, do inglês <i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CFU	Unidade de formação de colónias, do inglês <i>colony-forming unit</i>
CPD	Citrato- fosfato-dextrose do inglês <i>Citrate phosphate dextrose</i>
DL	Doença dos Legionários
DMSO	Sulfóxido de dimetilo do inglês <i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
ELISA	Ensaio imunoenzimático do inglês <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FBS	Soro de boi fetal do inglês <i>fetal bovine serum</i>
g/l	Gramas por litro
GM-CSF	Fator de estimulação de granulócitos- macrófagos do inglês <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
H	Hora
HIV	Vírus da imunodeficiência humana do inglês <i>human immunodeficiency virus</i>
IFA	Imunofluorescência indireta do inglês <i>Indirect fluorescent antibody test</i>
IPST	Instituto Português do Sangue e da Transplantação
kg	Quilograma

LCV	Vacúolo com <i>Legionella</i> do inglês <i>Legionella containing vacuole</i>
Lp	<i>Legionella pneumophila</i>
Lp sg1	<i>Legionella pneumophila</i> serogrupo 1
LPS	Lipopolissacarídeo
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
ml	Mililitros
mM	Micromolar
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico, do inglês <i>peripheral blood mononuclear cell's</i>
PBS	Tampão fosfato do inglês <i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase de DNA, do inglês <i>polymerase chain reaction</i>
PMA	Acetato miristato de forbol, do inglês <i>phorbol myristate acetate</i>
RAPD	Amplificação aleatória de fragmentos de DNA, do inglês <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RBL	Letina fúngica, do inglês <i>Rhizoctonia bataticola lectin</i>
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
RFLP	Polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição, do inglês <i>restriction fragment length polymorphism</i>
RPM	Rotação por minuto
rRNA	RNA ribossomal

TLR Recetores do tipo toll, do inglês *toll-like receptor*

µg Micrograma

µl Microlitro

1. Introdução

1.1. Enquadramento histórico

A importância das bactérias do género *Legionella* foi reconhecida após ter ocorrido um surto de uma doença respiratória grave, em Julho de 1976. Este surto afectou 182 das 4400 pessoas que assistiam à 58ª convenção da Legião Americana, no Hotel Bellevue Stratford, em Filadélfia. Em 147 dos casos foi necessária hospitalização, tendo-se registado 29 óbitos.

Apesar da intensa investigação laboratorial, a origem do surto não foi detetada, no entanto, as investigações epidemiológicas sugeriam que a exposição tinha ocorrido no hotel, sendo excluída a hipótese de transmissão direta (Fraser e col., 1977).

Cerca de 6 meses mais tarde, dois investigadores do Centro de prevenção e doença dos Estados Unidos (CDC), Joseph McDade e Charles Shepard, anunciaram que tinham descoberto o agente etiológico da doença, um bacilo gram-negativo pleomórfico, não ácido-resistente. O agente foi isolado em cobaias previamente inoculadas, com uma suspensão de tecido pulmonar de quatro doentes que tinham morrido com a infeção (McDade e col., 1977).

Devido à associação histórica com a convenção da Legião Americana, a doença foi designada como Doença dos Legionários (DL) e a bactéria designada como *Legionella pneumophila* (Lp), incluída posteriormente no género *Legionella*, criado em 1979 (Brenner e col., 1979).

Recorrendo a estudos retrospectivos evidenciou-se que a bactéria já tinha sido responsável por casos de doença em anos anteriores (Hébert e col., 1980). Um exemplo foi a epidemia de infeção respiratória, sem componente pneumónica, relacionada com as instalações do sistema de ar condicionado do edifício público do Departamento da Saúde de Pontiac, que ocorreu em 1968, quadro clínico mais tarde designado por Febre de Pontiac (Glick e col., 1978).

Ao longo dos anos têm vindo a ser publicados vários casos de infeção por *Legionella* quer sob forma de casos esporádicos ou de epidemias.

Muito recentemente (Outubro/Novembro, 2014) em Portugal, no concelho de Vila Franca de Xira, ocorreu uma epidemia, com grande impacto na opinião pública. No total, foram notificados 417 casos com suspeita de DL, em 334 dos quais foi confirmada a infeção por *Legionella pneumophila* serogrupo 1 (*Lp* sg1). Foram reportados 10 óbitos (Shivaji e col., 2014). A análise microbiológica, ambiental e epidemiológica, identificou os sistemas de arrefecimento industriais como a provável fonte de infeção. Este foi o maior surto ocorrido em Portugal até à data, e um dos maiores relatados na Europa.

1.2. Bactéria do género *Legionella*

1.2.1. Taxonomia e filogenia

A família *Legionellaceae* e o género *Legionella*, bem como a espécie *pneumophila* foram estabelecidos por Brenner e colaboradores em 1979, utilizando a homologia de DNA.

De modo a validar taxonomicamente a família *Legionellaceae*, Ludwig e colaboradores, em 1983 caracterizaram a subunidade 16S do rRNA de quatro espécies de *Legionella* (*L. pneumophila*, *L. bozemani*, *L. Jordanis*, e *L. micdadei*), constatando que estas espécies se encontravam filogeneticamente muito próximas, formando uma linhagem distinta das outras espécies. Foi confirmado mais tarde por Woese, em 1987, que a família *Legionellaceae* pertencia à subdivisão γ -2 da classe das *Proteobacteria*, ideia corroborada em 1990 por Murray e colaboradores.

A classificação em géneros gerou alguma discórdia, alguns autores defendem a divisão da família *Legionellaceae* em 3 géneros distintos: *Legionella*, *Tatlockia* e *Fluoribacter* (Garrity e col., 1980). No entanto, a maioria dos autores defende a ideia de um único género para todos os microrganismos “*legionella like*” devido às características fenotípicas semelhantes entre eles, embora a homologia do DNA em relação ao da espécie *L.p* seja reduzida.

Ao longo do tempo, têm sido descritos vários métodos para classificar microrganismos da mesma espécie, baseados na análise de DNA, tais como ribotipagem (Cordevant e col., 2003; Saloum e col., 2002), RAPD (Lo Presti e col., 2001), RFLP da

subunidade ribossomal 16S-23S (Hookey e col., 1995; Riffard e col., 1998) e a sequenciação do gene *mip* (Ratcliff e col., 2002; Fry e col., 2007). Os métodos baseados em ensaios de PCR são os que têm revelado um melhor poder discriminativo (Fry e col., 2007). Embora a sequência do gene 16S rRNA, seja o marcador molecular mais usado em estudos filogenéticos de *Legionella*, a sua utilidade tem sido questionada devido à heterogeneidade existente entre cópias do gene em muitas das espécies e à reduzida variação inter-espécie (Dahllof e col., 2000). Em 2002, a equipa de Ratcliff verificou que o gene *mip* possuía uma alta variabilidade podendo ser utilizado para diferenciar espécies deste género (Ratcliff e col., 2002).

Para resolver o desacordo a nível da filogenia, Gee e colaboradores em 2003 sugeriram usar uma ampla diversidade de sequências genómicas, e mais tarde Jeffroy e colaboradores em 2006 de modo bastante criterioso, fizeram uma seleção dos genes, permitindo assim reduzir a incongruência filogenética.

Atualmente, foram identificadas mais de 60 espécies distintas de *Legionella* abrangendo 70 serogrupos (Mercante e Winchell, 2015) sendo que aproximadamente metade foram isoladas a partir de amostras clínicas e todas consideradas potencialmente patogénicas (Muder e col., 2002; Pearce e col., 2012). A *Lp* é responsável por aproximadamente 90% dos casos de DL, 84% dos quais são devido à *Lp* sg1. As espécies e os serogrupos pertencentes ao género *Legionella*, têm vindo a aumentar, tendo a espécie *Lp*, 16 serogrupos identificados até ao momento (Palusińska-Szys e col., 2009).

1.2.2. Morfologia e características gerais da bactéria

A bactéria *Legionella* é um bacilo curto, pleomórfico, que pode apresentar forma filamentosa, sendo um bacilo geralmente móvel, à exceção de *Legionella okakridgensis* (Brenner e col.; 1994). É uma bactéria não esporulada, possuindo fimbrias e um ou mais flagelos de localização polar ou subpolar (Thomason e col., 1979); (Rogers e col., 1980), que podem ser evidenciados pela coloração de Ryu modificada.

Estas bactérias podem ser observadas em produtos biológicos tais como, expectoração, secreções brônquicas, lavado bronco-alveolar, apresentando-se por vezes

como coco-bacilos tendo entre 0,3 e 0,9 μm de largura e entre 2 -20 μm de comprimento.

A *Legionella*, quando corada pela coloração de Gram é uma bactéria Gram-negativo, corando com alguma dificuldade.

A bactéria não cresce nos meios de cultura convencionais usados para o isolamento de outras bactérias potencialmente patogénicas. A maioria das espécies de *Legionella* cresce em meio BCYE existindo, no entanto, algumas que têm dificuldade em crescer neste meio de cultura (Lee e col.,1993).

A *Lp*, uma das espécies mais estudadas até ao momento, dentro do seu hospedeiro natural apresenta um ciclo de vida bifásico com características fenotípicas distintas, alternando entre uma fase replicativa e uma fase transmissiva (Molofsky e col., 2004).

1.2.3. Epidemiologia

A bactéria *Legionella* é ubíqua da água doce do ambiente, amplamente disseminada em rios, lagos, lagoas, fontes, nascentes de água quente e também em ambientes húmidos, como terra para jardinagem, fazendo parte do ecossistema microbiano (Fliermans., 1996; Fliermans e col., 1981) (Figura 1). Nestes ambientes naturais a concentração do microrganismo é reduzida, comparativamente com os ambientes artificiais criados pelo homem, tais como, instalações termais, jacuzzis, equipamentos de terapia respiratória, torres de arrefecimento de ar condicionado. Estes ambientes apresentam condições que favorecem a multiplicação da bactéria, amplificando o inóculo (Desplaces e col.,1984; Guo e col.,2014). Recorrendo a estudos retrospectivos verificou-se que quase todos os casos de DL podem ser atribuídos a ambientes de água artificiais em vez de ambientes aquáticos naturais (Coetzee e col.,2012). A exceção a este nicho ecológico é *L. longbeachae*, que pode encontrar-se noutros locais, nomeadamente terra utilizada para jardinagem (Steele e col.,1990).

O microrganismo pode sobreviver em ambientes húmidos por longos períodos de tempo, resistindo a temperaturas entre os 0 e os 68°C, e a um pH compreendido entre 5 e 8.5 (Diedereen e col.,2008). A bactéria, em sistemas de água artificiais, é pouco suscetível a tratamentos efetuados com biocidas e cloro, porque se associa com a

biofilmes nas superfícies destes sistemas (Farhat e col., 2012). Estes fornecem proteção e um gradiente específico de determinados nutrientes, sustentando assim a sobrevivência e a replicação da *Legionella* fora do hospedeiro (Rogers e col., 1994); (Sheehan e col., 2005).

A infeção do Homem ocorre através da inalação de aerossóis contaminados (Blatt e col., 1993) com a bactéria, com um diâmetro entre 1 e 5 μm , gerados a partir da água de chuveiros e torneiras (Dennis e col., 1982; Breiman e col., 1990); equipamento de ventilação assistida (Mastro e col., 1991); torres de arrefecimento e condensadores do sistema de ar condicionado (Mercante e Winchell., 2015). A infeção depende da eficácia da formação e disseminação do aerossol e de fatores como temperatura, humidade relativa do ar, velocidade de circulação do ar e do tamanho das gotas.

A *Legionella* é frequentemente isolada de águas naturais, no entanto essas fontes não estão diretamente implicadas com a transmissão da bactéria, com exceção de instalações termais naturais, adaptadas para banhos públicos (Miyamoto e col., 1997). Lowry e colaboradores em 1991 sugeriram que outra via possível de transmissão da bactéria poderia ser através da contaminação direta de feridas cirúrgicas com água contaminada.

Muito recentemente, Correia e colaboradores em 2016 demonstraram existir uma provável transmissão da DL indivíduo a indivíduo, no seguimento do surto decorrido em Portugal, Vila Franca de Xira. Até à data ainda não tinha sido documentado na literatura qualquer outro caso de transmissão pessoa a pessoa.

A suscetibilidade do hospedeiro é um dos fatores preponderantes na epidemiologia e patogenia da DL, sendo que a maioria dos casos afeta indivíduos do sexo masculino com idade superior a 50 anos, com doença pulmonar obstrutiva e imunossupressão (Hicks e col.; 2011; ECDC, 2011). Para além destes, existem outros doentes em risco, tais como doentes com diabetes, neoplasias e insuficiência renal em fase terminal. (Marston e col., 1994; Straus e col., 1996). Mais recentemente Misch e colaboradores em 2013, sugeriram que mutações no TLR6 poderá estar associada com o risco para contrair DL.

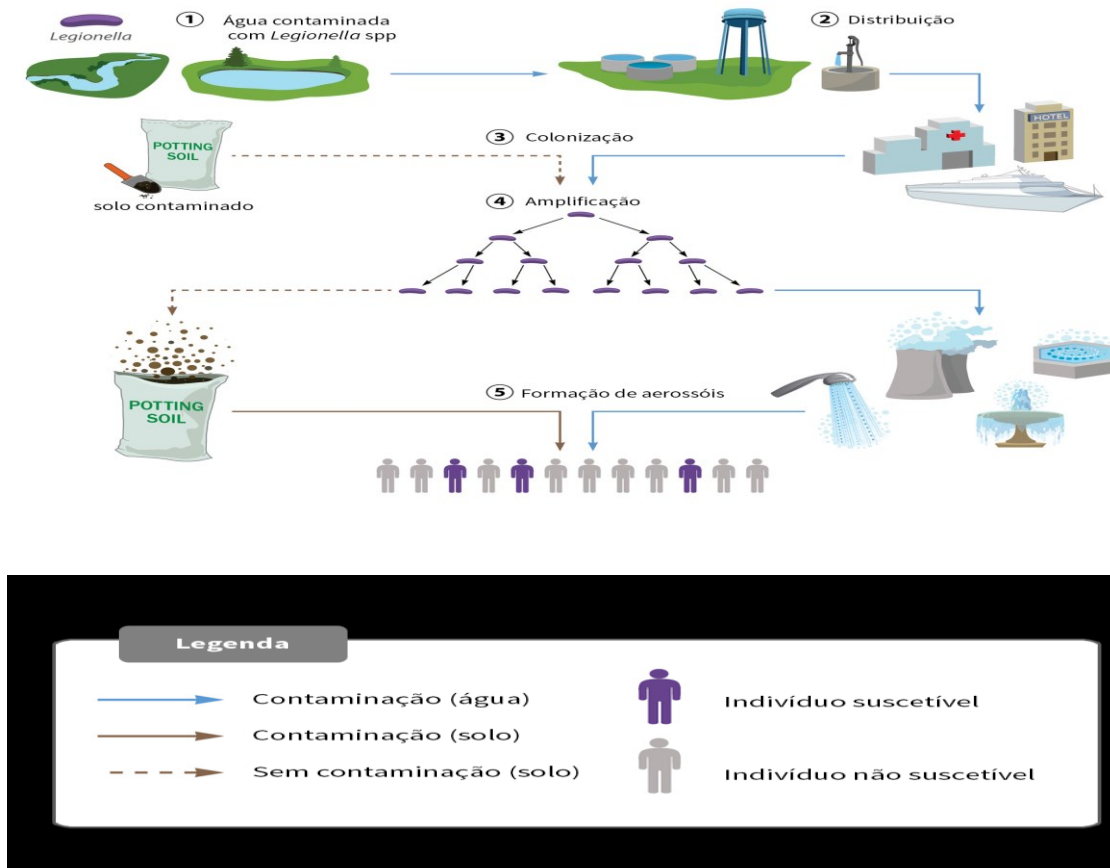


Figura 1- (1) Disseminação da bactéria *Legionella* a partir de fontes de água doce, (2) que é distribuída em baixas concentrações, (3) que vai colonizar redes de canalização predial e sistemas de refrigeração, (4) que amplificam o inóculo sob condições ambientais favoráveis, (5) subsequente aerossolização de água contaminada e exposição do Homem (Adaptado de Mercante e Winchell., 2015).

1.3. Patógenese

1.3.1. O Ciclo intracelular

A capacidade de manipulação de processos celulares, permite aos microrganismos estabelecer um nicho replicativo intracelular. Este é um dos mecanismos chave das bactérias para proliferar dentro do hospedeiro, que por sua vez desenvolve mecanismos de defesa de modo a limitar a infeção intracelular (Shin e Roy, 2008).

A *Lp* é considerada uma bactéria patogénica oportunista e tem como principal característica a sua capacidade de multiplicação intracelular (Fields e col., 2002).

A interação de *Lp* com células eucarióticas é, a chave para compreender a capacidade da bactéria causar doença no hospedeiro.

A bactéria consegue resistir à destruição e multiplicar-se no interior de protozoários como a *Acanthamoeba castellanii*, *Hartmannella vermiformis*, *Naegleria spp.*, bem como *Dictyostelium discoideum*. Os mecanismos celulares envolvidos na replicação da *Legionella* dentro da ameba, o seu hospedeiro natural, são semelhantes aos observados em células humanas, especialmente macrófagos e células epiteliais, hospedeiros acidentais da bactéria (Newton e col.,2010).

A bactéria entra nos monócitos ou macrófagos por mecanismos de fagocitose, permanecendo no fagossoma, que se rodeia por organelos celulares como mitocôndrias, vesículas e pelo retículo endoplasmático rugoso (RER), inibindo desta forma a fusão com o lisossoma (Horwitz e col., 1983; Tilney e col.,2001) (Figura 2). Assim, após a inalação pelo Homem de aerossóis contaminados com *Lp*, a bactéria resiste à degradação subsequente ao processo endocítico, replicando-se no interior da célula e desencadeando o início da infeção (Hilbi e col.,2011). No entanto, a capacidade da *Lp* para parar ou bloquear a progressão dos lisossomas depende da célula hospedeira.

Em linhas primárias de macrófagos a fusão do vacúolo que contém a bactéria com o lisossoma é detectada 15 horas após infeção (Sturgill-Koszycki e col.,2000) e em monócitos humanos a fusão com os lisossomas não é detetada em nenhum momento da infeção (Sauer e col.,2005).

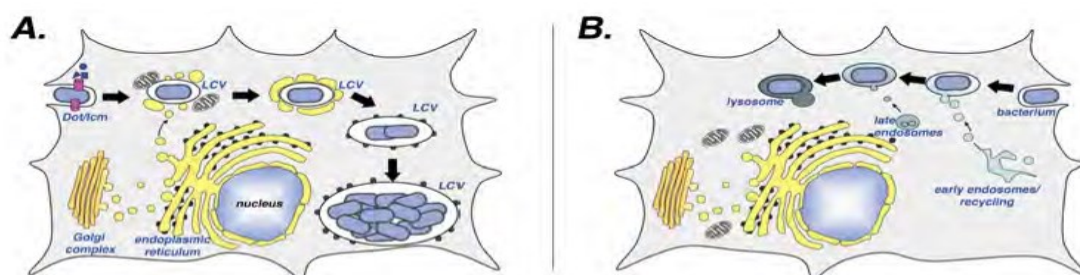


Figura 2- *Lp* modula o tráfico do vacúolo estabelecendo um nicho replicativo

(A) Ciclo da *Lp* no interior do vacúolo de fagocitose: após a ingestão por amebas ou macrófagos, o vacúolo com a *Legionella* (LCV) evita o transporte para a via lisossomal, rodeando-se de vesículas derivadas do retículo endoplasmático e mitocôndrias, formando, assim, um compartimento muito diferente do que é observado em outros microorganismos não patogénicos. Dentro deste LCV a bactéria inicia a sua replicação;

(B) Ciclo de um microorganismo não patogénico: fusão do vacúolo de fagocitose com o lisossoma e posterior transporte para a via lisossomal (Adaptado de Isberg e col.,2009).

1.4. Manifestações Clínicas

A infecção por *Legionella* pode apresentar-se sob duas formas clinicamente distintas, a DL, uma pneumonia grave (McDade e col.,1977) e a Febre de Pontiac, uma infecção brônquica autolimitada (Glick e col.; 1978).

O diagnóstico da febre de Pontiac é feito com base em dados epidemiológicos, clínicos e evidências microbiológicas ambientais. Os dados clínicos e epidemiológicos demonstram que a doença tem um curto período de incubação (4 horas a 2-3 dias), sendo caracterizada por síndrome gripal e apresentando sintomas como febre, mal estar, mialgia e cefaleias. Não existem evidências de que a idade, o género e o tabagismo sejam fatores considerados de risco para desenvolver a doença (Tossa e col.,2006). Por estas razões esta doença é geralmente sub-diagnosticada.

Alguns autores põem em questão se a *Legionella* é, de fato, o agente etiológico da Febre de Pontiac (Edelstein e col.,2007). De modo a explicar a Febre de Pontiac, têm surgido inúmeras hipóteses que incluem alterações nos fatores de virulência da bactéria e também reações tóxicas e de hipersensibilidade no hospedeiro (Steinert e col., 2002).

A DL é uma forma de pneumonia grave, cuja etiologia muitas vezes não é diagnosticada. A incapacidade de diagnosticar a DL deve-se por um lado a uma falta de sensibilização clínica e por outro devido à especificidade do diagnóstico da *Legionella* (Fields e col., 2002). As características desta doença, incluem sintomas clínicos como febre, mialgias, cefaleias, tosse não produtiva, calafrios, dispneia, diarreia (Tsai e col.,1979). Os sinais e sintomas não são patognomónicos da Doença, sendo que o diagnóstico necessita de confirmação laboratorial (Edelstein e col.,1993). Numa radiografia, não é possível distinguir esta infecção de outras pneumonias, embora infiltrados alveolares sejam mais comuns na DL (Macfarlan e col.,1984).

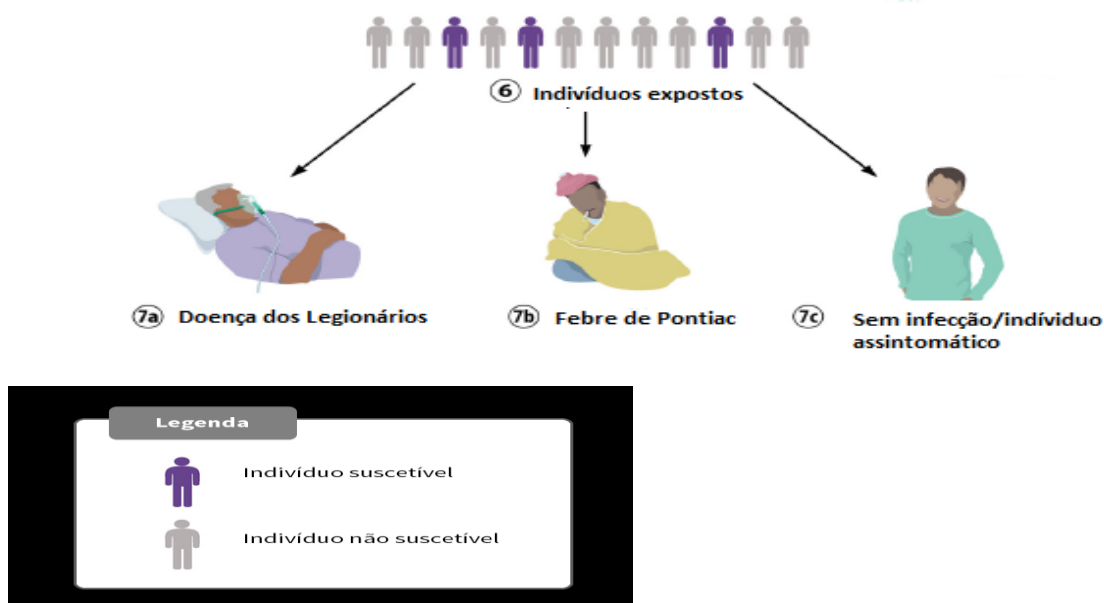


Figura 3- (6) A população exposta inclui indivíduos com susceptibilidade elevada e indivíduos sem susceptibilidade (7a) os indivíduos suscetíveis devido à idade ou condições médicas subjacentes são os que apresentam um maior risco de desenvolver DL (7b) ambos os grupos estão em risco de contrair a Febre de Pontiac. (7c) existem indivíduos que podem contactar com a bactéria permanecendo assintomáticos (Adaptado de Mercante e Winchell.,2015).

1.5. Diagnóstico Laboratorial

1.5.1. Isolamento da bactéria

O método de diagnóstico por cultura, continua a ser o método (*gold-standart*) para a deteção e diagnóstico da infeção por *Legionella*. (Fields e col.,2002; Heuner e col.,2008). As amostras preferenciais para o isolamento de *Legionella*, incluem amostras do tracto respiratório inferior como expectoração, secreções brônquicas e lavado bronco-alveolar (Maiwald e col.,1998). A cultura deve ser sempre realizada, antes da administração de antibioterapia.

A sensibilidade deste método para a deteção de *Legionella* a partir de amostras clínicas é altamente variável, estando compreendida entre 10 e 80%, no entanto a sua especificidade é de aproximadamente 100%. A qualidade da amostra, bem como a experiência e competência dos profissionais de laboratório contribuem para valores de sensibilidade díspares (Murdoch e col.,2003).

O meio de cultura adequado para o isolamento de *Legionella* tem que ser suplementados com extracto de levedura, carvão, α -cetoglutarato e L- cisteína, como

por exemplo o meio BCYE- α . Como os produtos biológicos provêm de locais não estéreis, encontrando-se potencialmente contaminados, é usualmente adicionado ao meio antibiótico. As culturas são incubadas a 35°C-37°C, durante 10 dias (Pasculle e col., 1980; Edelstein e col., 1981). A maioria das espécies de *Legionella* tem um crescimento entre 2 a 5 dias. No entanto, existem outras que requerem tempos de incubação mais longos que podem ir até duas semanas (Blyth e col., 2009; Fields e col., 2005).

A observação das colónias é feita diariamente ou em dias alternados, pesquisando-se colónias redondas, convexas, de bordos ligeiramente irregulares, translúcidas, de superfície lisa e brilhante, tornando-se viscosas à medida que a cultura envelhece. São observadas à lupa e têm um aspecto bastante característico semelhante a “ vidro moído”, (Figura 4) por vezes com um tom anilado (Marques, 1996).

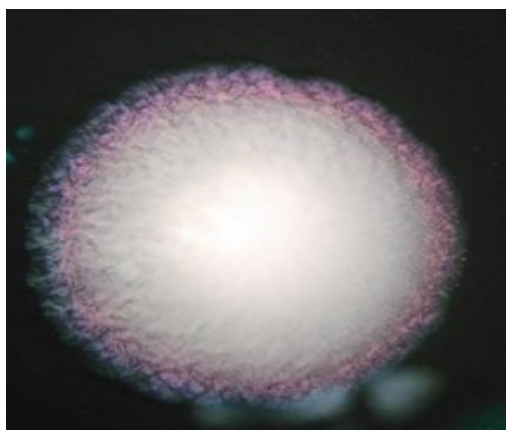


Figura 4 - Imagem de colónia de *Legionella* obtida à Lupa (40x) durante o trabalho experimental.

1.5.2. Detecção de anticorpos

A imunofluorescência indirecta (IFA) foi uma das metodologias utilizada, à posteriori, para detetar anticorpos em pacientes do surto de Filadélfia, sendo fundamental na determinação da causa da doença. Desde então têm sido desenvolvidos métodos serológicos para detetar anticorpos contra *Legionella* (Harrison e col., 1988). De entre eles a IFA e a ELISA são os mais frequentemente utilizados. Actualmente, o método de ELISA é o mais utilizado porque é o mais sensível, menos subjectivo e tem

potencial para ser automatizado (Malan e col.,2003; Boshuizen e col.,2003). As sensibilidades dos testes serológicos variam substancialmente, situando-se entre 41 e 94% (Malan e col., 2003).

A especificidade da IFA, utilizando o antígeno da *Lp* sg1 é aproximadamente 99% (Harrison e col.,1988; Wilkinson e col.,1981). A maior limitação dos testes serológicos, é o tempo da seroconversão, que pode demorar algumas semanas, ou nem chegar a existir uma vez que um grande número de doentes apresenta imunocomprometimento. Aproximadamente 25-45% dos indivíduos com a DL, seroconvertem após uma semana do aparecimento dos sintomas (Den Boer e col.,2004). Na maioria dos casos, um aumento de 4 vezes o título de anticorpos é detetado dentro de 3 a 4 semanas, mas já foram reportados casos em que só foram detetados anticorpos ao fim de 10 semanas (Monforte e col.,1988).

No entanto, indivíduos expostos ao contacto com a bactéria, com serologia positiva para *Legionella*, podem apresentar-se assintomáticos (Boshuizen e col.,2001).

A incapacidade de detetar todas as espécies e serogrupos de *Legionella*, é também uma grande desvantagem dos testes serológicos. A seroconversão para a *Lp* sg 1 é utilizada para o diagnóstico, no entanto para as outras espécies e outros serogrupos a sensibilidade e especificidade não tem sido confirmada (Murdoch e col.,2003). O diagnóstico serológico permite detetar casos confirmados de doença ou casos prováveis dependendo do título de anticorpos, do serogrupo e do número de determinações. É considerado diagnóstico confirmado quando ocorre um aumento significativo do título de anticorpos em amostras emparelhadas para *Lp* sg1. É considerado um caso provável quando ocorre aumento do título de anticorpos em amostras emparelhadas para *Lp* não sg1 ou título único para *Lp* sg1 (Commission Implementing Decision 2012/506/EU de 8).

1.5.3. Detecção do antígeno urinário

A deteção do antígeno na urina para *Lp* sg1, é actualmente o teste laboratorial mais usado (82 a 97%), tendo revolucionado o diagnóstico laboratorial da DL (Hicks e col., 2011; Viasus e col.,2013). O antígeno detetado é um componente lipopolissacarídeo da parede celular da *Legionella*, que é termoestável (Williams e col.,1995). A deteção do

antigénio na urina, combina uma razoável sensibilidade (70 a 90%) com uma alta especificidade (95% a 100%), apresentando inúmeras vantagens como, baixo custo, resultados rápidos, procedimento simples, facilidade na recolha de amostra, deteção do antigénio durante antibioterapia, entre outras. Os antigénios urinários específicos para *Lp* podem ser detetados na maioria das infeções causadas por *Lp* pouco tempo após o aparecimento dos sintomas clínicos (2-3 dias), no entanto pode ser excretado por um período superior a 10 meses (Jarraud e col.,2013; Sopena e col.,2002). A técnica de deteção de antigénios na urina pode ser efetuada através de dois métodos, ELISA e imunocromatografia (ICT).

Ao longo dos anos, esta metodologia melhorou significativamente as taxas de diagnóstico, permitindo a implementação precoce do tratamento específico (Beaute e col.,2013; Engel e col.; 2013).

A única desvantagem desta técnica é permitir apenas a deteção de casos de DL provocados por *Lp* sg1 (Fields e col.,2002; Mercante e Winchell,2015).

1.5.4. Deteção de DNA

O método de biologia molecular mais utilizado é a PCR que permite a amplificação de pequenas quantidades de DNA e a obtenção de resultados num curto período de tempo. As diferentes técnicas de PCR utilizadas no diagnóstico foram direcionadas principalmente para regiões específicas dentro dos genes 16S-rRNA (Jonas e col., 1995; Rantakokko-Jalava e col.,2001;Stolhaug e col.,2006), a região 23S-5S (Herpers e col.,2003), 5S-rDNA (Murdoch e col.,1996; Kessler e col.,1993) e o gene *mip* (Ratcliff e col., 1998).

O DNA da *Legionella* pode ser detetado em amostras de urina, soro, *buffy-coats* obtidas de pacientes com DL, sendo que a sensibilidade de deteção varia entre 30-86% (Diederen e col.,2007). No soro a sensibilidade é relativamente baixa (50-60%), aumentando para 70 a 90% nos casos mais severos de doença (Diederen e col., 2007). A utilização da PCR para outro tipo de amostras, excluindo as respiratórias apresenta alguns benefícios, particularmente em pacientes que têm dificuldade em produzir expectoração.

A PCR tem a vantagem de detetar qualquer espécie de *Legionella* e serogrupo e tem demonstrado uma sensibilidade igual ou superior à da cultura em amostras do tracto

respiratório inferior (Cloud e col., 2000; Templeton e col., 2003). É considerado um diagnóstico provável de doença quando é detetado DNA de *Legionella* em secreções respiratórias do tecido pulmonar ou de algum local predominantemente estéril (Commission Implementing Decision 2012/506/EU de 8).

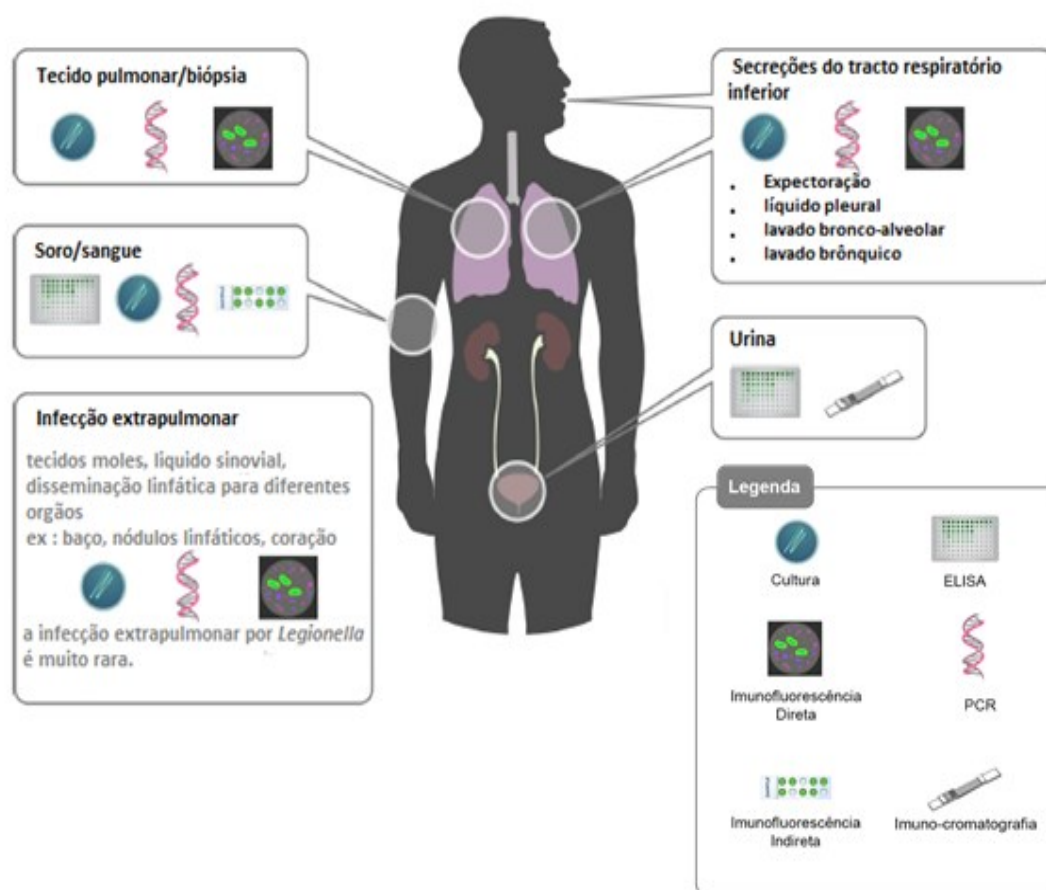


Figura 5 – Tipos de amostras e métodos de diagnóstico para determinação de uma potencial infecção por *Legionella*.

Algumas técnicas são aplicáveis a mais do que um tipo de amostras.. Em geral, o sucesso da deteção de *Legionella* depende da severidade da doença, integridade da amostra, eficiência do laboratório e em particular das características do teste (Adaptado de Mercante e Winchell., 2015).

1.6. Terapêutica

Para o tratamento da DL ser eficaz é de extrema importância iniciar a terapêutica precocemente, sendo que quando esta é feita de forma adequada a taxa de mortalidade da doença é reduzida cerca de 2 a 6 vezes. A bactéria responsável pela DL é

intracelular, assim um antibacteriano com penetração intracelular em macrófagos, tem uma probabilidade de eficácia contra a bactéria mais elevada (Palusińska–Szysz e Cendrowska–Pinkosz, 2009). Os macrólidos, fluoroquinolonas, tetraciclina, rifamicinas estão incluídos neste grupo de antibacterianos. A eritromicina foi o primeiro macrólido utilizado no 1º surto de DL que ocorreu em 1976 em Filadélfia (Fraser e col., 1977). No entanto, novos estudos indicaram que as fluoroquinolonas e os novos macrólidos apresentam uma penetração intracelular e uma actividade superior à eritromicina (Blazquez e col., 2005). Dentro dos macrólidos, a azitromicina tem demonstrado ter melhor atividade que a eritromicina e claritromicina. Das fluoroquinolonas, a levofloxacina e gemifloxacina parecem ser os mais ativos. As fluoroquinolonas têm sido recomendadas para receptores de transplante com DL porque, ao contrário de macrólidos e rifampicina, estes não interferem com a terapia imunossupressora (Stout and Yu 1997). Blazquez e colaboradores em 2005, verificaram que pacientes que manifestaram a doença submetidos a terapia com fluoroquinolonas tiveram um menor tempo de internação e uma diminuição da taxa de complicações em comparação com doentes tratados com macrólidos.

A resposta ao tratamento depende da idade do paciente, o seu estado imunitário, e se a terapêutica é feita no tempo adequado. A resposta ao tratamento é em geral rápida (cerca de 10 dias), caso se trate de indivíduos imunocompetentes.

Durante o tratamento, deve-se ter em conta alguns casos em particular, onde podem estar envolvidos outros microrganismos, resultando numa infecção polimicrobiana.

1.7. Hospedeiros acidentais de *Legionella*

1.7.1. Monócitos e macrófagos

Os monócitos, os macrófagos e as células dendríticas são as células do sistema imunitário responsáveis pela fagocitose (Figura 6). A sua principal função consiste em regular a homeostase, no entanto estão também envolvidas em processos de inflamação, auto-imunidade e infeção (Chow e col., 2011).

Os monócitos são produzidos na medula óssea e diferenciam-se em macrófagos após a sua entrada nos tecidos, desempenhando um papel fundamental na imunidade inata (Geissman e col., 2010). Estas células circulam no sangue periférico, na medula óssea e no baço, contém recetores de quimiocinas e recetores específicos dos agentes patogénicos (Frederic e col., 2010). Os monócitos são a maior célula no sangue periférico (15 a 18 μm), possuem um núcleo irregular por vezes lobulado, com cromatina de aspecto reticular. O citoplasma cora de azul acinzentado, com finas granulações azurófilas (grânulos ricos em esterase) e apresenta vacúolos ou inclusões citoplasmáticas.

Os macrófagos estão presentes nos tecidos linfóides e não linfóides, tendo características morfológicas bastante distintas dos monócitos (Mosser e Edwards., 2008).

Os macrófagos são células de grandes dimensões (10 a 30 μm), apresentando um núcleo oval com uma reentrância que lhe atribui uma morfologia em forma de rim. Estas células existem em quase todos os tecidos do corpo e possuem características morfológicas variáveis que dependem do seu estado de actividade funcional.

Uma das suas principais funções é a apresentação de antígenos aos linfócitos e a secreção de citocinas (Gordon e col., 2007). Estas células estão presentes em praticamente todos os tecidos, diferenciando-se a partir de células mononucleares de sangue periférico (PBMC's), que migram para os tecidos no estado estacionário ou em resposta a uma inflamação. As PBMC's desenvolvem-se a partir de uma célula progenitora mielóide que é precursora de diferentes tipos de células, como os neutrófilos, eosinófilos e basófilos (Mosser e Edwards., 2008).

A diferenciação de monócitos em macrófagos implica um aumento da sua capacidade fagocítica, bem como do número de lisossomas, que contém as enzimas hidrolíticas necessárias à destruição dos antígenos.

O homem é considerado o hospedeiro acidental da *Lp*, razão pela qual a bactéria infeta e se replica nos macrófagos alveolares. De modo a estudar este mecanismo *in vitro* nos macrófagos, tem-se recorrido a diferentes estratégias que permitam a diferenciação destas células a partir de monócitos.

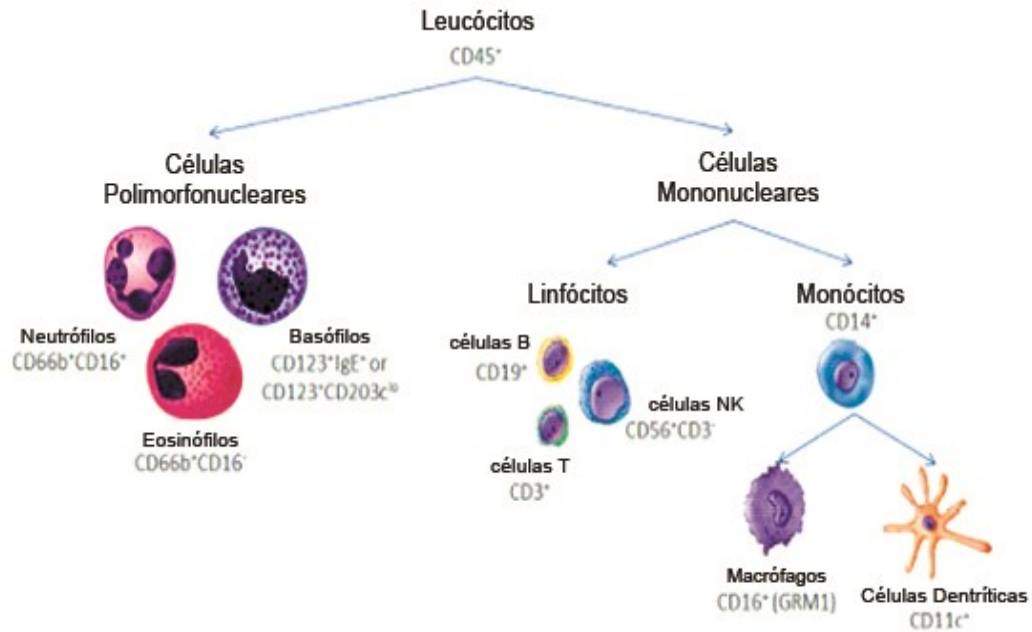


Figura 6- Esquema representativo dos diferentes tipos de leucócitos e moléculas expressas na sua superfície (Adaptado de <http://cnx.org/content/m46701/latest/> http://www.pc.maricopa.edu/Biology/rcotter/BIO%20205/LessonBuilders/Chapter%2014%20LB/cow95289_14_09b).

1.8. Cultura de células

1.8.1. Culturas Primárias

A cultura primária pode derivar de um tecido animal ou vegetal. Pode ser um tecido dissociado enzimaticamente ou células do sangue que não necessitam de dissociação. De modo a providenciar o seu crescimento, é necessário efetuar uma sub-cultura destas células. Após a primeira sub-cultura, a cultura primária denomina-se linha celular. A preparação de culturas primárias é muito laboriosa e a sua manutenção *in vitro* apenas é possível por um período limitado de tempo (são finitas). As células que possuem uma maior capacidade de crescimento vão predominar, resultando numa uniformidade genotípica e fenotípica na população.

1.8.2. Culturas contínuas

As linhas celulares contínuas podem ser repetidamente cultivadas durante semanas ou meses. Estas linhas celulares podem derivar de tumores, no entanto a sua transformação pode também ser induzida usando oncogenes virais e tratamentos químicos. Estas linhas após transformação têm a vantagem de apresentarem uma disponibilidade ilimitada mas a desvantagem de possuírem poucas características do tecido original.

As culturas contínuas são constituídas por um único tipo de células que se podem propagar em cultura até um determinado número de divisões celulares (cerca de 30). Estas células são geralmente diplóides mantendo assim um certo grau de diferenciação até perderem a sua capacidade de proliferação.

1.8.3. Requerimentos da cultura celular

De modo a satisfazer as necessidades nutricionais das diferentes linhas celulares, existem meios de cultura com distintas composições.

O pH do meio é uma das propriedades fundamentais, as células requerem níveis de pH entre 7.2 e 7.4 e a manutenção destes valores é crucial para obter condições óptimas de cultura. A avaliação regular do nível de pH dos meios de cultura é de extrema importância, pelo que os meios de cultura mais utilizados no laboratório, como o RPMI-1640, incluem o vermelho fenol como indicador de pH. Deste modo, é possível controlar o pH visualmente: um pH de 7,4 corresponde a uma coloração avermelhada, pH entre 7,4 e 7,6 a uma coloração rosa, pH=7 a tons laranja e para valores abaixo de 6,5 o meio de cultura adquire uma cor amarelada.

Os sais orgânicos são igualmente fundamentais, uma vez que estes fornecem iões de sódio, potássio e cálcio. São necessários para a ligação à matriz celular, como cofactores de enzimas, mantêm o equilíbrio osmótico das células e regulam o potencial da membrana.

A osmolalidade das células em cultura, é também indispensável e deve ser mantida entre 260 mOsm / kg e 320 mOsm / kg (osmolaridade do plasma humano é de 290 mOsm / kg, pelo que é inferido ser este o valor adequado para as células em cultura). Os hidratos de carbono, tais como galactose e glicose são também um dos componentes importantes, representando uma fonte de energia. A sua concentração varia entre 1-4,5 g/l, consoante o tipo de células.

É também importante adicionar ao meio de cultura aminoácidos (glutamina em particular), uma vez que são necessários para a proliferação celular, isto é, caso estes não se encontrem disponíveis ocorre um decréscimo na densidade celular. De modo a prolongar a viabilidade celular e estimular o crescimento celular adiciona-se à cultura aminoácidos essenciais.

As vitaminas, como a riboflavina, biotina e tiamina são utilizadas frequentemente em meios de cultura, embora alguns meios necessitem de vitaminas do complexo B e também vitamina A e E.

A temperatura e a viscosidade são também factores preponderantes que podem influenciar a cultura celular.

Nas culturas celulares e em situações específicas pode haver a necessidade de adicionar antibióticos, como é o caso das culturas primárias para evitar contaminações. No entanto, existem diversas desvantagens associadas à sua utilização, tal como seleção de microorganismos resistentes aos antibióticos (Freshney, 2010).

1.8.4. Isolamento de culturas primárias

O isolamento de células é amplamente utilizado em muitas vertentes de investigação biológica e biomédica bem como em terapia clínica, permitindo a investigação em diversas áreas como medicina regenerativa, doenças oncológicas e HIV. Atualmente, é possível obter células individuais, a partir de uma população heterógena, permitindo assim, o estudo de cada tipo celular (Tomlison e col., 2012).

Para estudar funcionalmente um determinado tipo de célula, é necessário isolar as várias populações de células presentes numa amostra, recorrendo a métodos de separação físicos e imunológicos (Freshney, 2010).

O isolamento das células é um procedimento que só é possível através da doação de sangue ou a recolha de tecidos específicos que requerem procedimentos invasivos tais como broncoscopia e biópsia (Gordon e col., 2000).

A utilização de protocolos com linhas primárias tem como principal limitação a necessidade de um elevado número de células, para além disso as culturas primárias não sendo imortalizadas possuem um número de duplicações limitado (Daigneault e col., 2010). No caso dos monócitos o seu número no sangue é de aproximadamente 5,3 % (Arosa e col., 2007) pelo que é necessário um grande volume de sangue para obter um número de células suficiente para prosseguir com o isolamento celular.

As linhas celulares monocíticas têm a vantagem de ser mais facilmente obtidas que as linhas celulares de macrófagos. Pelo que a utilização de linhas de macrófagos diferenciadas a partir de monócitos é comum, no entanto, nem sempre permite prever com precisão o comportamento dos macrófagos teciduais (Daigneault e col., 2010).

Os princípios de isolamento de células baseiam-se na conjugação de um ou vários parâmetros específicos, relacionados com as características específicas de cada célula.

A adesão celular (Tomlinson e col., 2012), a densidade celular e a afinidade de anticorpos para moléculas específicas na superfície da célula são métodos relativamente simples, económicos e que não requerem alta tecnologia.

1.8.4.1. Isolamento baseado na densidade celular

O isolamento celular baseado em diferentes perfis de densidade pode ser realizado numa solução com gradiente de densidade utilizando a centrifugação (Al Mufti e col., 2004).

Assim, de modo a realizar-se eficientemente esta técnica (Figura 7), uma amostra de células tem de ser centrifugada usando uma força centrífuga e um período de tempo suficientes que permita às células chegarem a um ponto em que o seu gradiente seja igual à sua própria densidade (Pretlow e Pretlow, 1989). As soluções de gradiente mais utilizadas são o Ficoll e o Percoll. O Ficoll consiste num polímero de sacarose que apresenta uma densidade superior à das células mononucleares do sangue periférico (PBMC-s) mas inferior à dos eritrócitos e granulócitos permitindo uma separação específica dos diferentes componentes. O Percoll consiste em esferas de sílica coloidal

revestidas com polivinilpirrolidona que permite a formação de gradientes de densidade a alta centrifugação (Pertoft e col.,1978). O primeiro reagente é o mais usualmente utilizado porque causa menos danos osmóticos às células (Sykes e col.,1970).

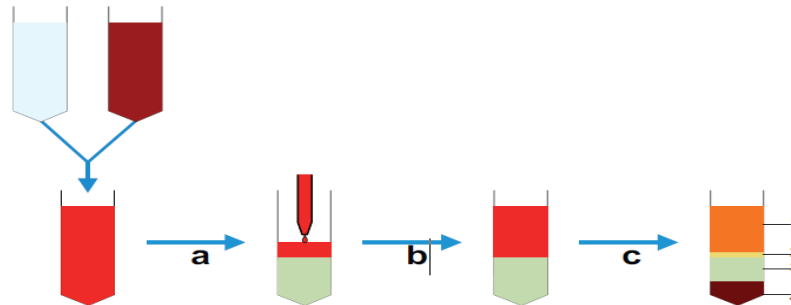


Figura 7 - Esquema representativo do isolamento de células por gradiente de densidade. (a) Inicialmente, o sangue total é diluído num tampão de solução salina (PBS) (b) Após centrifugação é distribuído cuidadosamente na solução de Ficol (c) Após outra centrifugação, a velocidade apropriada são observadas fases distintas; (1) – plasma (2) – PBMC's (3) - Ficol e (4) - eritrócitos e granulócitos; As células são posteriormente recolhidas da interfase (Adaptado de Tomlinson e col.,2012).

1.8.4.2. Adesão celular

A adesão celular é um dos métodos mais simples e utilizados como rotina para a separação de células, por exemplo, monócitos de linfócitos.

A utilização de técnicas baseadas na adesão celular permite a separação das células de uma forma bastante simples e económica. No entanto, este método não é específico e o seu sucesso depende por um lado, da afinidade das células para aderirem a um determinado tipo de material, e por outro lado, pode existir mais do que um tipo de células a aderir. Esta técnica, quando comparada com outros métodos de separação, apresenta algumas desvantagens, é um processo demorado e inespecífico, resultando num menor grau de pureza celular. No entanto, recorre-se a esta técnica quando a pureza celular não é um dos objectivos primordiais e quando o isolamento de várias subpopulações não é necessário (Tomlinson e col.,2012).

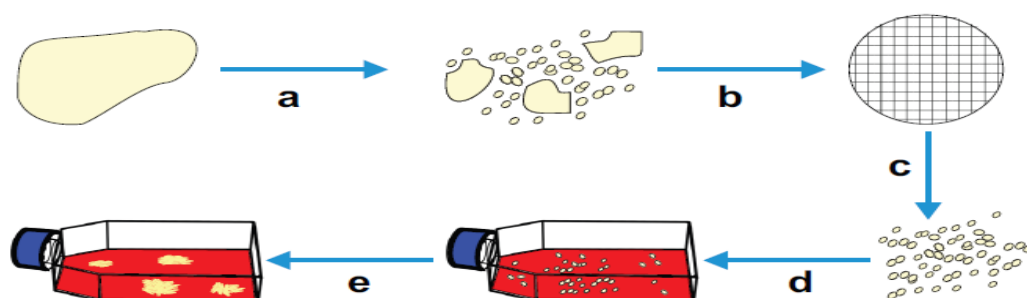


Figura 8 - Esquema de isolamento de células pela adesão ao plástico. (a) O tecido é fragmentado numa suspensão de células por meios mecânicos ou enzimáticos ou combinação de ambos (separações de sangue e aspirados de medula óssea não requerem esta etapa) (b) As células são filtradas de modo a remover aglomerados (c) Suspensão com um único tipo de células (d) Junção a uma superfície aderente (e) Após período de cultura observam-se a adesão das células alvo (Adaptado de Tomlinson e col.,2012).

1.8.4.3. Magnetic-activated cell sorting (MACS)

Entre as técnicas de isolamento de células que têm como base a ligação ao anticorpo, uma das mais utilizadas é a MACS (*magnetic-activated cell sorting*).

A tecnologia MACS utiliza anticorpos ligados a micropartículas de óxido de ferro que se ligam às células alvo, que através de um campo magnético são separadas das restantes. Esta tecnologia utiliza sequencialmente quatro tipos de estratégias de separação: seleção positiva, eliminação de células indesejadas, seleção negativa e saída sequencial. Na figura 9 encontram-se representadas as diferentes fases deste método, primeiramente as células não marcadas são eluídas e as células marcadas são retidas na coluna sobre a ação de um campo magnético até serem removidas, obtendo-se duas populações distintas.

A tecnologia MACS combina a utilização de campos magnéticos de gradiente elevado com pequenas micropartículas (Molday e Molday, 1984) e com a marcação fluorescente (Miltenyi e col., 1990). Estas micropartículas são biodegradáveis e apresentam magnetização apenas na presença de um campo magnético externo, e estão conjugadas com anticorpos altamente específicos para um antígeno de superfície celular. Assim, esta técnica que permite um isolamento de células com elevado grau de pureza (Tomlison e col.,2012).

Os métodos de separação que têm como base a ligação ao anticorpo são considerados o método de referência para a seleção de populações individuais (Tomlison e col.,2012).



Figura 9 - Esquema representativo de uma separação magnética (MACS) (1) Colocação da coluna de separação num campo magnético e adição da suspensão de células marcadas (2) Rejeição das células não marcadas (3) Remoção do campo magnético e eluição das células marcadas (células alvo) (Adaptado de Tomlinson e col.,2012).

1.9. Linhas celulares monocíticas

As linhas contínuas iniciaram-se na década de 70 quando um conjunto de linhas celulares hematopoiéticas humanas representante de células neoplásicas *in vivo* foi estabelecido *in vitro* por Minowada e colaboradores. Na tentativa de estabelecer linhas celulares foram realizadas várias experiências de diferenciação em linhas tumorais usando mitogénio (Colins e col., 1977; Gallagher e col.,1979).

As linhas celulares monocíticas têm sido largamente utilizadas para estudar as funções dos macrófagos dado que as linhas primárias de macrófagos são difíceis de obter e não se multiplicam *in vitro*.

Em diversos estudos, têm sido demonstrado que as linhas celulares monocíticas como a U937, a HL-60 e a TPH-1, podem diferenciar-se em macrófagos após estímulo com phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) ou 1,25-dihydroxyvitamin D3 (VD3) (Daigneault e col.,2010; Pujari e col.,2015).

A linha celular U-937 foi estabelecida em 1975 a partir de um paciente com um linfoma histiocítico (Sundström e Nilsson 1976), apresentando características morfológicas, citoquímicas e funcionais como: morfologia monocítica, perfil monocítico-mielóide, capacidade de secreção de lisozima (Ralph e col.,1976), capacidade reduzida de fagocitose (Sundstrom e Nilsson, 1976) e cariótipo aneuplóide (Zech e col., 1976). O fenótipo desta linha celular é único, não se comparando com qualquer outra linha de células hematopoiéticas (Nilsson e col., 1981).

As características fenotípicas das células U-937 sugerem que estas representam monócitos imaturos (Sundström e Nilsson 1976), e após induzida a sua diferenciação, as células sofrem de uma mudança morfológica gradual e maturação funcional semelhante ao que está descrito para diferenciação de células monocíticas primárias (Koren e col., 1979; Nilsson e col., 1980).

A linha celular THP-1 é uma linha celular que foi estabelecida a partir de um paciente com leucemia monocítica aguda (Tsuchiya e col., 1980). Koefler em 1986, descreveu que contrariamente a outras linhas celulares, estas células não apresentam anormalidades cromossómicas.

A linha celular HL60 foi estabelecida a partir de um paciente do sexo feminino com leucemia mielóide aguda (Collins e col., 1977). A leucemia foi diagnosticada pela primeira vez como leucemia promielocítica aguda no entanto, uma reavaliação das amostras do paciente indicaram que se tratava de uma leucemia mieloblástica aguda (Dalton e col., 1988).

1.10. Objetivos do estudo

A Lp é uma bactéria capaz de invadir e de se multiplicar em células eucariotas, incluindo monócitos humanos e células epiteliais. No entanto, outras espécies pertencentes ao género *Legionella*, tal como *L. steigerwaltii*, não têm capacidade de se multiplicar em monócitos humanos (Fields e col., 1986).

As fases do ciclo de vida da bactéria e os factores que promovem a sua replicação dentro da célula fagocítica e a sua transmissão para um novo hospedeiro têm sido objecto de diversos estudos utilizando linhas contínuas. Deste modo, para estudar a multiplicação intracelular da *Legionella in vitro* têm sido utilizadas as linhas U937, HL-60, TPH-1, Mono Mac 6.

Neumaister e colaboradores em 1997 demonstraram que existem algumas espécies de *Legionella* e que se multiplicam intracelularmente em Mono Mac 6, como é o caso de *L. steigerwaltii*, *L. gormanii*, *L. pneumophila* sg 6, *L. pneumophila* sgl, *L. bozemanii*, *L. oakridgensis* e *L. micdadei*. Sendo que, as espécies *L. longbeachae* sg 1, *L. jordanis*, *L. anisa* e *L. dumoffi* não apresentam esta capacidade.

Alli e colaboradores em 2003 demonstraram que a *Lp* sg1, *L. dumoffi* e *L. micdadei* podem replicar-se dentro de U937, sendo citopatogénicas após 72 h, manifestando altos níveis de crescimento intracelular. Verificaram ainda, que outras espécies não possuíam essa capacidade.

Muito recentemente, Lawrence e colaboradores em 2015, demonstraram que *L. longbeachae*, *L. quinlivanii* e *L. londiniensis*, isoladas a partir do ambiente têm capacidade para infetar e replicar dentro de macrófagos humanos diferenciados a partir da linha celular monocítica THP-1. Verificaram também que, a espécie *Lp* pode invadir e multiplicar-se nestas células após um período de 48h.

As fases do ciclo de vida da bactéria e os fatores que promovem a sua replicação dentro da célula fagocítica e a sua transmissão para um novo hospedeiro têm sido objecto de numerosos estudos utilizando diferentes espécies de amibas e linhas contínuas, no entanto, não existem estudos realizados em linhas primárias humanas.

Neste âmbito surge o interesse neste trabalho experimental, que teve como principal objetivo estudar o processo de replicação da *Legionella* em macrófagos, obtidos por diferenciação de culturas primárias de monócitos humanos.

O presente trabalho tem como principais objetivos:

1. Obter linhas primárias de macrófagos a partir de *buffy-coats* de dadores voluntários;
2. Avaliar a capacidade da *Lp* infetar linhas primárias de macrófagos humanos;
3. Avaliar se a capacidade infecciosa da *Lp* é dependente do grupo sanguíneo do dador;
4. Analisar o processo infeccioso: determinar as taxas de multiplicação intracelular da *Lp*;
5. Avaliar a eficiência da infeção e a capacidade citotóxica das bactérias provenientes da lise celular.

2. Material e Métodos

2.1. Culturas primárias

Neste trabalho experimental foram utilizadas linhas primárias obtidas de sangue periférico. Para o isolamento PBMC's recorreu-se a concentrados leuco-plaquetários (*buffy-coats*) obtidos de dadores voluntários (Anexo I) , fornecidos e eticamente aprovados pelo Instituto Português do Sangue e da Transplantação- IPST.

2.1.1. Isolamento de células mononucleares de sangue periférico

As PBMC's foram isoladas por centrifugação mediante uma separação em gradiente de Ficoll. O protocolo de isolamento é iniciado com concentrado leuco-plaquetário de 2 dadores. O processo está representado esquematicamente na Figura 10 e o protocolo experimental encontra-se descrito posteriormente.

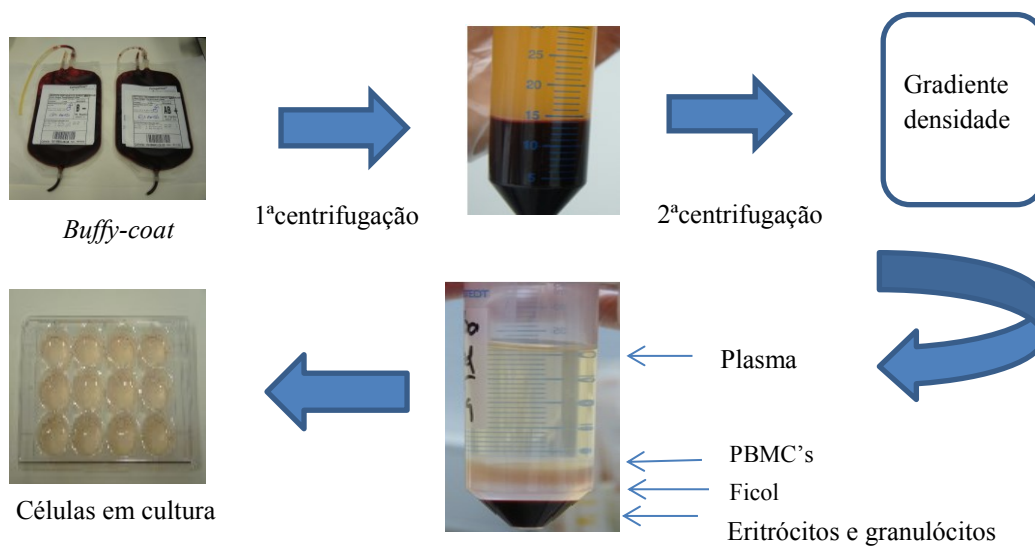


Figura 10 - Esquema do isolamento de PBMC's realizado durante o trabalho experimental.

Protocolo experimental:

- Distribuir os *buffy-coats* por 2 tubos de 50 ml.
- Diluir o volume em PBS (Anexo IV) numa proporção de 3:2 (30 ml por frasco).
- Centrifugar 2500 rpm, 10 minutos (desaceleração 1).
- Preparar o Ficoll (Biochrom AG) (a solução deve ser mantida à temperatura ambiente) e adicionar 12 ml de Ficoll a 2 tubos de 50 ml.
- Prosseguir apenas com 1 dador, escolhendo o que tem maior anel e que não tenha plasma avermelhado.
- Remover a camada intermédia (leucócitos) para um novo tubo, retirando previamente o plasma.
- Perfazer com PBS até um volume final de 40 ml.
- Homogeneizar a solução e distribuir cuidadosamente e distribuir pelos tubos 2 com o Ficoll (20 ml em cada tubo). Adicionar gota-a-gota pela parede do tubo.
- Centrifugar a 2500 rpm, durante 20 minutos (desaceleração 0).
- Retirar as PBMC's (anéis da amostra) para um novo tubo de 50 ml.
- Perfazer com PBS até aos 50 ml, diluindo 4 vezes aproximadamente.
- Centrifugar a 1200 rpm durante 10 minutos.
- Desprezar o sobrenadante e ressuspender com PBS até aos 10 ml.
- Retirar uma alíquota para contar (180 μ l PBS + 20 μ l de amostra).
- Contar as PBMC's, usando uma câmara de *Neubauer* (usar quadrado central, sendo suficiente contar 5 dos 25 quadrados).
- Centrifugar a 900 rpm, durante 5 minutos, de forma a remover as plaquetas.
- Retirar o sobrenadante, adicionando RPMI-1640 (Anexo IV) completo de modo a obter uma concentração de 20×10^6 PBMC's /ml.

2.1.2. Congelação e descongelação de células mononucleares de sangue periférico

A fim de preparar as células para o processo de congelação realizou-se os seguintes passos:

Protocolo experimental:

- Ressuspender cuidadosamente as células, numa concentração de $12,5 \times 10^6$ PBMC's/ml, em meio RPMI suplementado com FBS 20 %.
- Adicionar às células gota a gota o meio de congelação, o qual é composto por RPMI-1640, suplementado com FBS a 20% e DMSO a 20%.
- A concentração final de células corresponde a 6,25 células/ ml em meio RPMI-1640 com 20 % FBS e 10% DMSO.
- Misturou-se a suspensão de células e distribuiu-se pelo número adequado de criotubos, de maneira que cada um conter um volume de 800 μ l, correspondendo a 5×10^6 PBMC's.
- Transferiu-se os criotubos para um "Mr Frosty" (Nalgene) e colocou-se num congelador a -80°C .
- Depois de um mínimo de 24 horas, removeu-se os criotubos do recipiente, sendo armazenados num congelador a -80°C para serem utilizados posteriormente.
- Descongelar rapidamente as células, agitando os criotubos em banho maria a 37°C .
- Contar o número de células congeladas de modo a comparar ao número original de PBMC's antes da congelação.
- Ressuspender as células em PBS até 10 ml e centrifugar a 800 rpm durante 10 minutos.
- Remover o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 800 μ l RMPI completo (volume original).
- Retirar uma nova alíquota para uma vez mais determinar o número de PBMC's na amostra.
- Contar as células em a câmara de *Neubauer* com Azul Tripiano.

2.1.3. Adesão de monócitos

O processo de adesão permite que os monócitos aderiram à placa. Este processo requiere os seguintes passos:

- Ressuspender as células em RPMI completo.
- Pipetar 2 ml para cada poço de uma placa de 12 poços.
- Incubar as placas de cultura durante 30-45 minutos na estufa de CO₂ a 37°C.
- Após incubação o fundo da placa fica opaco com as células aderentes, os monócitos.
- Remover o meio com as células não aderentes (linfócitos).
- Lavar duas vezes com meio RPMI simples.
- Colocar RPMI completo em todos os poços da placa.

2.2. Isolamento de monócitos usando o *kit* de selecção positiva “CD14 *MicroBeads*” (Miltenyi)

O procedimento para este isolamento é igual ao isolamento de PBMC's excepto os dois últimos pontos.

Assim, após o isolamento e contagem das PBMC's procedeu-se à separação das células CD14+ :

- Calcular o volume necessário de *beads* e tampão *beads*:

$$\text{Volume de tampão beads} = \frac{\text{n}^{\circ}\text{células} \times 80 \mu\text{l}}{3 \times 10^7}$$

$$\text{Volume de CD14 Microbeads} = \frac{\text{n}^{\circ}\text{células} \times 20 \mu\text{l}}{3 \times 10^7}$$

- Ressuspender as células nos volumes calculados anteriormente (o tampão e as *beads* devem sempre ser mantidos no gelo).
- Incubar a 5 °C (banho) durante 15 minutos.

- Adicionar 1-2 ml de tampão *beads* por cada 10^7 células.
- Centrifugar a 1200 rpm, 10 min (para remover as *beads* que não estão ligadas às células) e descartar o sobrenadante.
- Preparar a coluna: colocar no suporte e lavar com 3 ml de tampão *beads* (não deixar secar a coluna).
- Ressuspender a suspensão celular em 500 μ l de tampão *beads* por cada 10^8 células.
- Caso o número de células seja superior a 400×10^6 , passar a suspensão por um *cell strainer* de 40 μ m.
- Aplicar a suspensão celular na coluna.
- Lavar a coluna adicionando 3 vezes 3 ml de tampão *beads*. Tudo o que sai da coluna até aqui corresponde à fracção CD14-, a qual poderá também ser utilizada, se desejado.
- Remover a coluna do magneto e colocar num novo tubo de 15 ml.
- Pipetar 5 ml de tampão *beads* para dentro da coluna e inserir imediatamente o êmbolo: as células marcadas magneticamente serão removidas da coluna (tirar alíquota para contar).
- Centrifugar a 1200 rpm, 10 minutos (válido para qualquer uma das fracções).
- Contar o n° de células.

2.2.1. Diferenciação de monócitos em macrófagos

Este processo permite aos monócitos diferenciarem-se em macrófagos, sendo necessário 7 dias em cultura para que o processo esteja concluído.

Para a diferenciação utilizou-se uma concentração de $1,0 \times 10^6$ monócitos/ml e 1000 U/ml de GM-CSF.

Para tal, adiciona-se o GM-CSF à quantidade de RPMI completo necessário para colocar as células na concentração pretendida, posteriormente adicionou-se as células ao meio, misturou-se bem e distribuiu-se por placas de 12 e 6 poços.

Durante o período de cultura, é necessário efetuar a mudança do meio de modo a prolongar a viabilidade celular. Para tal, de 3 em 3 dias retirava-se 2,5 ml de meio e colocava-se 3 ml.

2.3 Estudos de viabilidade celular

O estudo da viabilidade celular é realizado normalmente, após a realização um isolamento celular, uma vez que podem ocorrer danos traumáticos para as células. O princípio básico desta técnica associa a integridade da membrana celular com a absorção ou libertação de um corante. No primeiro caso as células normais excluem o corante, no entanto quando ocorre uma danificação da membrana há uma penetração do corante na célula.

Um dos corantes mais utilizados, e que foi utilizado neste protocolo, é o azul tripano.

A solução de células é diluída numa proporção de 1:2 em 0,4% de azul tripano e de seguida observam-se as células na câmara de *Neubauer*.

2.4. Culturas

2.4.1. Cultura de monócitos e macrófagos

A cultura foi mantida *in vitro* através da utilização de meio RPMI-1640 (1X) (*gibco by life technologies*) suplementado com 10% (v/v) FBS, 2 mM L-glutamina (*gibco by life technologies*), 100 µg/ml estreptomicina/penicilina, 1 % (v/v) de aminoácidos não essenciais (*gibco by life technologies*), 1 % (v/v) de piruvato de Sódio (*gibco by life technologies*).

2.4.2. Cultura bacteriana

No presente trabalho foi utilizada a estirpe *Lp Paris*. A estirpe encontrava-se armazenada em meio de congelação (*skin milk*) a -70° C, sendo posteriormente inoculada em meio BCYE (Anexo II), durante dois dias a 37°C.

No início deste trabalho, realizou-se os ciclos de infeção utilizando *Lp* diretamente de uma placa de BCYE. Para tal, efetuou-se uma suspensão em RPMI-1640 com 2 a 3 colónias de uma cultura com 24h de crescimento a 37°C. Realizou-se a leitura da suspensão a OD_{550 nm} até atingir 1,2 (correspondente a $1,0 \times 10^9$ *Lp*/ml). A pureza da cultura foi previamente verificada à Lupa.

Numa segunda fase, passou-se a efectuar os ciclos de infeção utilizando a cultura líquida no início da fase estacionária.

2.4.2. Cultura líquida

Para realizar a cultura líquida foi necessário colocar 100 ml de meio AYE (Anexo III) num *Erlenmeyer* de 250 ml e inocular com 3 ansas de 1 µl de uma cultura *Lp* em BCYE. A cultura líquida foi realizada a 37°C a 170 rotações por minuto (rpm) (agitador Medline 3000).

Para realizar a infeção é necessário que a *Lp* se encontre na fase estacionária de cultura (fase transmissiva da bactéria), para tal, o crescimento da bactéria em meio AYE foi avaliado pela leitura da DO_{550 nm} (espectrofotómetro *Shimadzu* UV/1700).

Monitorização da cultura

- Monitorizar a densidade óptica de hora a hora até que esta atinga o estado estacionário.
- A partir da DO de 2000 efectuar diluições com o meio de cultura a fim de manter a linearidade da leitura.
- Considerou-se fase estacionária quando em leituras sucessivas a DO esteja compreendida entre 0,05 e 0,100.
- Colocar 5 ml de cultura de *Lp* num tubo de 15 ml.
- Centrifugar 15 minutos a 4000 rpm.
- Desprezar o sobrenadante.
- Adicionar 10 ml de RPMI simples e ressuspender as células.

- Efetuar a leitura da suspensão OD_{550 nm} de modo a obter uma DO = 1,2

A morfologia das bactérias foi confirmada através da observação ao microscópio óptico (Zeiss) com objectiva de 100x. A pureza da cultura líquida foi verificada semeando uma alíquota em BCYE- α e gelose de sangue.

2.5. Procedimento de Infeção

2.5.1. Contagem de células (Câmara de Neubauer)

Para se proceder à infeção de macrófagos com *Lp* foi necessário que o processo de diferenciação estivesse concluído.

Para efectuar uma infeção com uma proporção conhecida foi indispensável quantificar macrófagos e *Lp*. Pelo que, foi necessário a preparação de uma suspensão de células em cultura (monócitos ou macrófagos) e efectuar a contagem. Assim, foi necessário destacar as células (monócitos ou macrófagos) que estavam aderentes ao fundo da placa, com o auxílio de um raspador e proceder à sua contagem em Câmara de Neubauer. Posteriormente determinou-se o número de células/ml.

O número total de células por mililitro (total, viva ou morta) foi determinado da seguinte forma:

$$\text{Número de células/ml} = \text{Total de células} \times \text{DF} \times 10^4$$

O DF corresponde ao factor de diluição e 10^4 refere-se ao volume da câmara de Neubauer. A fim de se obter o número total de células existentes na suspensão o resultado da fórmula teve que ser multiplicado pelo volume da solução final (ml). As diluições foram efectuadas com PBS.



Figura 11 - Câmara de Neubauer utilizada para efetuar a contagem de células.

2.5.2. Infeção de monócitos e macrófagos

Para cada ciclo de infeção e de modo a confirmar ausência de contaminações, realizou-se um controlo negativo (poço com células não inoculadas com *Lp*).

A infeção de monócitos e macrófagos foi efectuada utilizando 3 diferentes proporções bactérias / células (*multiplicity of infection* - MOI) 10, 50 e 100.

A infeção de monócitos e macrófagos foi efectuada mediante a seguinte técnica:

- Antes de iniciar uma infeção remover o meio RPMI completo e adicionar o meio RPMI sem antibióticos.
- A cada poço da placa pipetar o volume necessário da suspensão de *Lp* de forma a obter os MOIs de 10, 50 e 100.
- Incubar a cultura durante 2 horas a 37°C a 5%CO₂
- Remover as bactérias extracelulares através da adição de 75µg/ml de gentamicina durante 1 hora a 37°C e 5% CO₂.
- Efetuar 3 lavagens com RPMI simples.
- Adicionar 3 ml de RMPI completo sem antibióticos.
- Colocar na estufa a 37°C e 5% CO₂.
- Observar a cultura ao microscópio invertido às 24 horas, 48 horas e 72 horas.

2.5.3. Quantificação de *Legionella pneumophila* Paris intra e extracelular

- A cada 24h, remover o sobrenadante da cultura, raspando as células aderentes (monocamada).
- Centrifugar as células a 15000 rpm durante 5 minutos, de modo a lisar as células (apenas para bactérias intracelulares).
- Preparar diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) em eppendorfs de 1,5 ml, utilizando o sobrenadante e o lisado das células.

- Para determinar o número de bactérias viáveis inocular cada diluição em meio BCYE, utilizando a técnica Miles (plaquear 3 gotas de 30 μ l, de cada diluição).
- Observar as placas para verificar se ocorreu crescimento de colónias de *Lp*.
- Determinar as UFC/ml existentes no sobrenadante (bactérias extracelulares) e nas células aderentes (bactérias intracelulares) por contagem das colónias após incubação das placas 5 dias a 37°C.
- A contagem foi efetuada na diluição que apresentou 3 a 30 CFU/ml por gota .

3. Resultados e Discussão

3.1. Isolamento e quantificação de células mononucleares de sangue periférico

Para obter as linhas primárias pretendidas (monócitos e macrófagos) para posteriormente se proceder à infeção com *Legionella*, recorreu-se ao isolamento de PBMC's a partir de sangue periférico de dadores voluntários.

Os critérios de seleção de dadores foram, preferencialmente pertencerem ao sexo masculino e com idade inferior a 65 anos e a colheita ser realizada em dia anterior ao do isolamento das PBMC's.

Em cada isolamento optou-se por iniciar o processo com *buffy-coats* de 2 dadores diferentes.

Após a primeira centrifugação, em que se obtém o anel correspondente à camada de leucócitos que se pretende isolar, foi necessário avaliar qual dos dadores possuía a maior camada, de modo a garantir que no final se obtinha o maior rendimento celular.

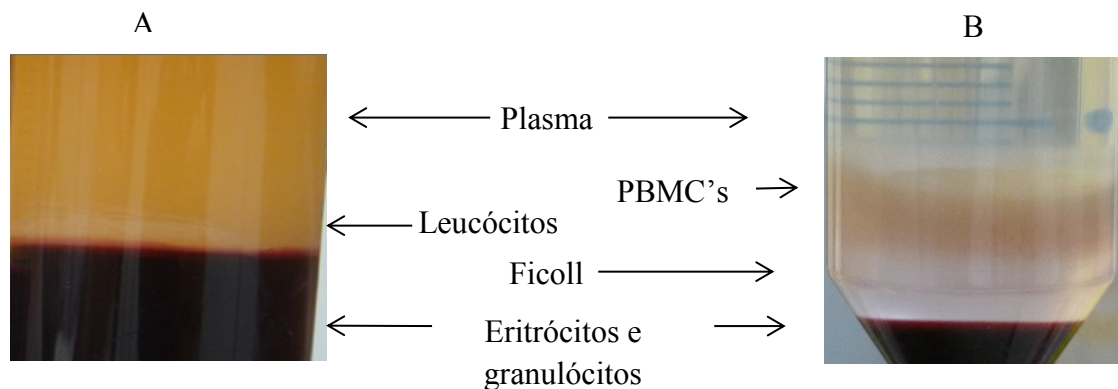


Figura 12 - (A) Anel de leucócitos obtidos após a 1ª centrifugação (B) Anel de PBMC's obtido após a 2ª centrifugação

Nesta fase, o objetivo primordial é recolher a camada de leucócitos que se encontra na interfase de modo a isolar posteriormente uma grande quantidade de PBMC's. Como é essencial uma grande quantidade leucócitos, é necessário retirar o anel da interfase e alguns granulócitos e eritrócitos que se encontram abaixo desta zona, uma vez que existem ainda leucócitos junto às células vermelhas. Se tal não acontecer, corre-se o risco de perder células, comprometendo o isolamento de PBMC's.

Numa fase inicial do trabalho experimental, verificou-se que os rendimentos obtidos com os dadores 1, 2 e 3 não foram muito elevados, obtendo-se quantidades de PBMC's inferior ao necessário para prosseguir com a técnica de adesão, sendo a média destes isolamentos de 50×10^5 PBMC's/ml (Tabela 1).

No decurso do protocolo e após retirar as células da interfase e efetuar a 2ª centrifugação teve-se especial cuidado, de modo a não contaminar a camada de PBMC's com glóbulos vermelhos. Este cuidado é de extrema importância para obter uma cultura com elevado grau de pureza.

Tabela 1 - Caracterização dos dadores e tipos de sangue utilizados no isolamento de células mononucleares de sangue periférico e respectivos rendimentos.

	Sexo	Idade	nº total de células mononucleares obtidas por saco de concentrado leuco-plaquetário
Dador ORH-	Feminino	26 anos	56×10^5 PBMC's
Dador ARH-	Feminino	25 anos	44×10^5 PBMC's
Dador ARH-	Feminino	19 anos	50×10^5 PBMC's
Dador ARH⁺	Masculino	30 Anos	487×10^5 PBMC's
Dador ARH⁺	Feminino	35 Anos	165×10^5 PBMC's
Dador ARH⁺	Masculino	52 Anos	635×10^5 PBMC's
Dador BRH⁺	Masculino	56 Anos	400×10^5 PBMC's
Dador ORH⁺	Masculino	60 Anos	615×10^5 PBMC's
Dador ORH⁺	Feminino	60 Anos	595×10^5 PBMC's

Dador ORH⁺	Masculino	26 Anos	425 x 10 ⁵ PBMC's
Dador ARH⁺	Masculino	21 Anos	625 X 10 ⁵ PBMC's
Dador BRH⁺	Feminino	18 Anos	350 x 10 ⁵ PBMC's
Dador ABRH⁺	Masculino	60 Anos	635 x 10 ⁵ PBMC's

Em média foi possível obter após o isolamento celular, um rendimento de 493,2 x 10⁵ PBMC's / ml. A figura 13, mostra uma imagem de PBMCs numa câmara de *Neubauer* antes de efetuada a contagem.



Figura 13 - PBMCs, em camara de Neubauer, após isolamento por gradiente de densidade (ampliação 400x).

Podemos verificar, na tabela 1 que dadores do sexo feminino têm valores de PBMC's/ml no final de cada isolamento inferiores aos dadores do sexo masculino, o que está em concordância com o valor de leucócitos normalmente presente neste sexo. Durante o presente trabalho não se efectuou a quantificação inicial de leucócitos pelo que não foi possível determinar o rendimento de cada processo de separação, que permitiria estabelecer uma relação entre o número de células isoladas e o número de células presentes no *buffy-coat* inicial.

Ao analisar a tabela 1, verifica-se que a idade dos dadores cujos *buffy-coats* foram disponibilizados pelo IPST está compreendida entre os 18 e 60 anos. Verificou-se que dos dadores com idades entre os 18 e os 35 anos, se obteve um rendimento de

PBMC's mais baixo, apresentando uma média de 275×10^5 PBMC's, e que nos dados com idades entre os 35 e 60, a média foi 576×10^5 PBMC's. Assim, a idade parece ser também um factor preponderante no rendimento obtido. No entanto, estes valores não são estatisticamente significativos devido ao baixo número de isolamentos efetuados.

Podemos verificar, na tabela 2 que o grupo sanguíneo mais frequentemente utilizado neste trabalho foi o A (n=6).

Tabela 2 - Número de dadores isolados por grupo sanguíneo

Grupo sanguíneo	Nº de isolamentos
A	6
0	4
B	1
AB	1

3.1.1. Adesão e cultura de monócitos

Nos ensaios de adesão efetuados foram utilizadas em média uma concentração de 20×10^5 PBMC's / ml em cada poço. Na Figura 14, apresenta-se o aspeto de um poço de uma placa de 6 poços, mostrando a grande densidade celular.

A técnica da adesão por ser inespecífica possui algumas desvantagens. Uma delas, é a necessidade de uma grande densidade celular porque os monócitos circulam numa pequena percentagem no sangue periférico e por isso para garantir que no final do processo de adesão existam monócitos suficientes para prosseguir com a cultura é necessário no início colocar grande número de PBMC's em cada poço da placa. Assim, como se colocou uma grande quantidade de PBMC's a aderir ocorreu a formação de aglomerados celulares, como se pode observar na figura 14, dificultando deste modo, a adesão de monócitos ao fundo da placa.

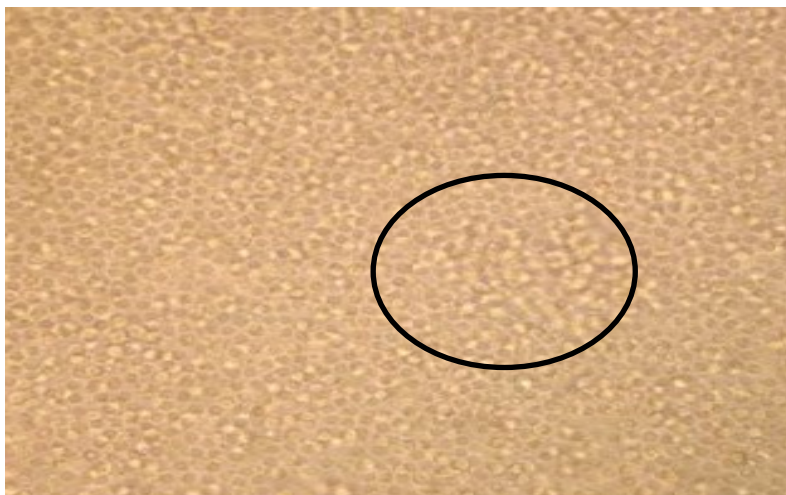


Figura 14 - PBMC's em cultura, observação ao microscópio de fundo invertido (ampliação de 400 x). O círculo a preto indica aglomerados celulares.

Por outro lado, a diferenciação em macrófagos está dependente do número de monócitos que adiram à placa. Como se pode verificar na figura 15, apesar de inicialmente a quantidade de PBMC's ser elevada, obteve-se um baixo número de células aderentes.



Figura 15 - Monócitos em cultura após adesão ao fundo da placa (Ampliação 400 x).

3.1.2. Isolamento de monócitos usando o *kit* de selecção positiva “CD14 *MicroBeads*” (Miltenyi)

Dado que o rendimento de monócitos obtido pelo método de adesão à placa foi baixo e, como já referido anteriormente, tem a desvantagem de ser inespecífico, não garantindo o grau de pureza celular, uma vez que pode existir mais que um tipo de células a aderir. Realizou-se o isolamento de monócitos utilizando o kit de selecção positiva (CD14 *Microbeads*), de modo a comparar o número de células obtidas de um isolamento por *panning* (adesão) e um isolamento utilizando o kit de selecção positiva.

Este isolamento permitiu a obtenção de células CD14⁺, uma vez que se utilizou *beads* específicas para este marcador. As células CD14⁺ (monócitos) correspondem à fração seleccionada positivamente, obtida após o êmbolo ter sido aplicado à coluna (tal como descrito em 1.8.4.3 e em 2.2). No final deste procedimento a população obtida corresponde exclusivamente a monócitos, enquanto que na técnica de adesão não podemos afirmar que todas as células aderentes à placa são monócitos.

Tabela 3 - Contagem de células obtidas por adesão e pelo kit “CD14 *Microbeads*”

	Contagem de PBMC's	Contagem de monócitos	Rendimento
Adesão	625 x 10 ⁵ PBMC's	100 x 10 ⁵ cél/ml	16%
Seleção positiva	580 x 10 ⁵ PBMC's	113,5 x 10 ⁵ cél/ml	19,6 %

Pode-se verificar através da tabela 3 que o isolamento de monócitos realizado através do kit de selecção positiva é mais eficaz que o método de adesão, o rendimento foi superior.

3.2. Diferenciação de monócitos em macrófagos

A diferenciação dos monócitos em macrófagos é realizada após a técnica de adesão ou seleção positiva e ocorre durante 7 dias (como descrito em 2.2.1). Numa primeira fase, do presente trabalho, efectuou-se um processo de diferenciação sem citocina, verificando-se que, após os 7 dias, não existiam alterações morfológicas características da transição monócito a macrófago. Numa segunda fase, utilizou-se GM-CSF, citocina específica que induz a diferenciação de monócitos em macrófagos.

Como, se pode verificar na figura 16, o GM-CSF induziu a adesão e a alterações morfológicas nas células após os 7 dias de diferenciação. Estas alterações começaram a ser visíveis ao fim de 4/5 dias.

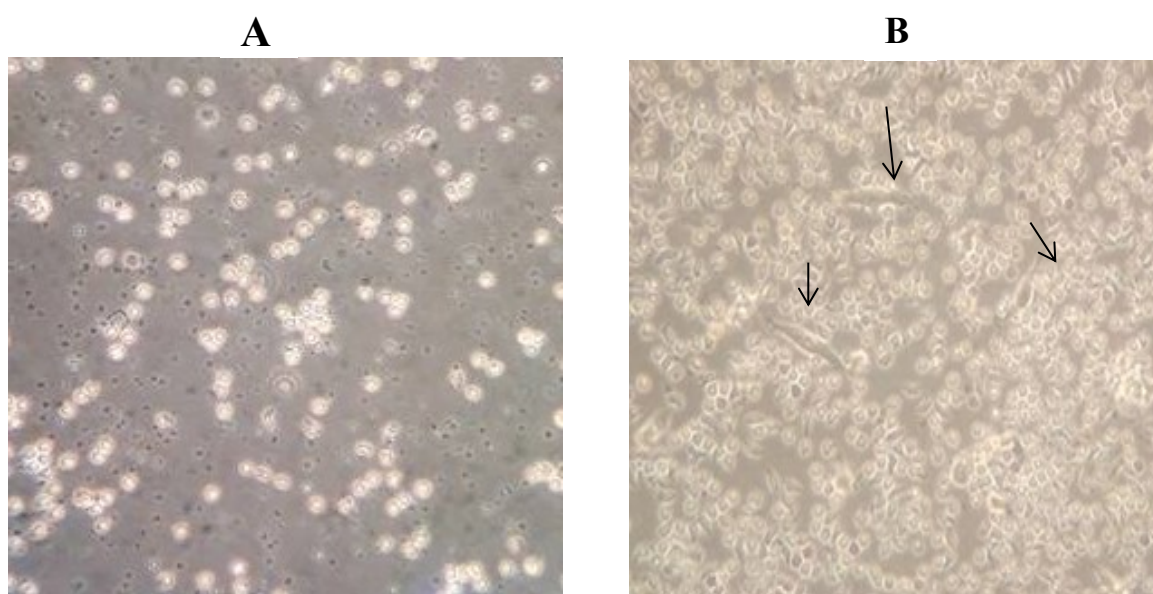


Figura 16 - (A) Monócitos após adesão (1º dia de diferenciação). (B) Macrófagos após 7 dias de diferenciação com GM-CSF (1 µg/ml). As setas indicam morfologia característica de macrófago.

3.3. Congelação de células mononucleares do sangue periférico

No início do estudo, um dos objetivos propostos era testar a viabilidade e infeciosidade da bactéria *Legionella*, proveniente de um ciclo de infeção anterior, isto é, pretendia-se efetuar infeções sucessivas utilizando a mesma linha primária, obtida a partir do mesmo dador. Para cada ciclo de infeção seria utilizada a *Lp* recolhida do ciclo anterior. Para tal, seria necessário recorrer à congelação de células após o isolamento. Com este procedimento pretendia-se garantir que todos os ensaios eram efetuados com as células nas mesmas condições, de modo a que evitar que os resultados dos diferentes ciclos de infeção fossem influenciados por alterações da linha celular.

A congelação de células humanas é um processo que pode levar à morte celular, isto é, a viabilidade celular é comprometida por este processo.

No nosso estudo após a descongelação das PBMC's verificou-se que ao colocar as células em cultura havia a formação de muitos aglomerados celulares, o que dificultou o processo de adesão de PBMC's ao fundo da placa.

Testou-se a viabilidade das células congeladas com azul tripano verificando-se uma perda de viabilidade, assim como uma diminuição do número de células, relativamente à contagem efetuada no dia do isolamento das PBMC's. Como os valores das contagens obtidos após o descongelamento (tabela 3) era suficiente para prosseguir com o protocolo de adesão e infeção optou-se por abandonar este desenho do estudo.

Na tabela 4, encontram-se os valores de PBMC's no dia do isolamento e após descongelação, verificando-se que houve uma diminuição no número de células, o que comprometeu o sucesso da técnica de adesão de monócitos e consequente diferenciação em macrófagos humanos.

Tabela 4 - Contagem de PBMC's antes e após descongelação

	Dia de isolamento	Após congelação
Dador ARH 30 anos	48,7 x 10 ⁶ PBMC's	24,0 x 10 ⁶ PBMC's/ml
Dador ARH 52 anos	63,5 x 10 ⁶ PBMC's	32,2 x 10 ⁶ PBMC's/ ml

3.4. Cultura de *Legionella pneumophila* Paris

Foram testadas dois tipos de culturas de *Lp* Paris, em placa de BCYE (24h de incubação) e em meio líquido (AYE).

Numa primeira fase, optou-se por realizar ciclos de infeção diretamente de uma placa de BCYE, fazendo uma suspensão em meio RPMI-1640, posteriormente utilizou-se uma cultura líquida. Esta decisão baseia-se no facto de não se pode garantir que a *Lp* proveniente da placa esteja em fase estacionária contrariamente ao que acontece na cultura líquida, que permite que haja monitorização da cultura e recolha no momento exato em que esta atinge a fase estacionária. Assim, as culturas em AYE foram monitorizadas por espectrofotometria de modo a obter *Lp* Paris em fase estacionária que corresponde a fase virulenta da bactéria. Na Tabela 5 apresenta-se um exemplo de uma curva.

Tabela 5 - Exemplo de leituras de *Lp* Paris a uma OD_{550 nm} em meio AYE

Horas	Densidade óptica
0h	0,0756
12h	1,691
20h	3,125
22h	3,621
24h	3,642
25h	3,521

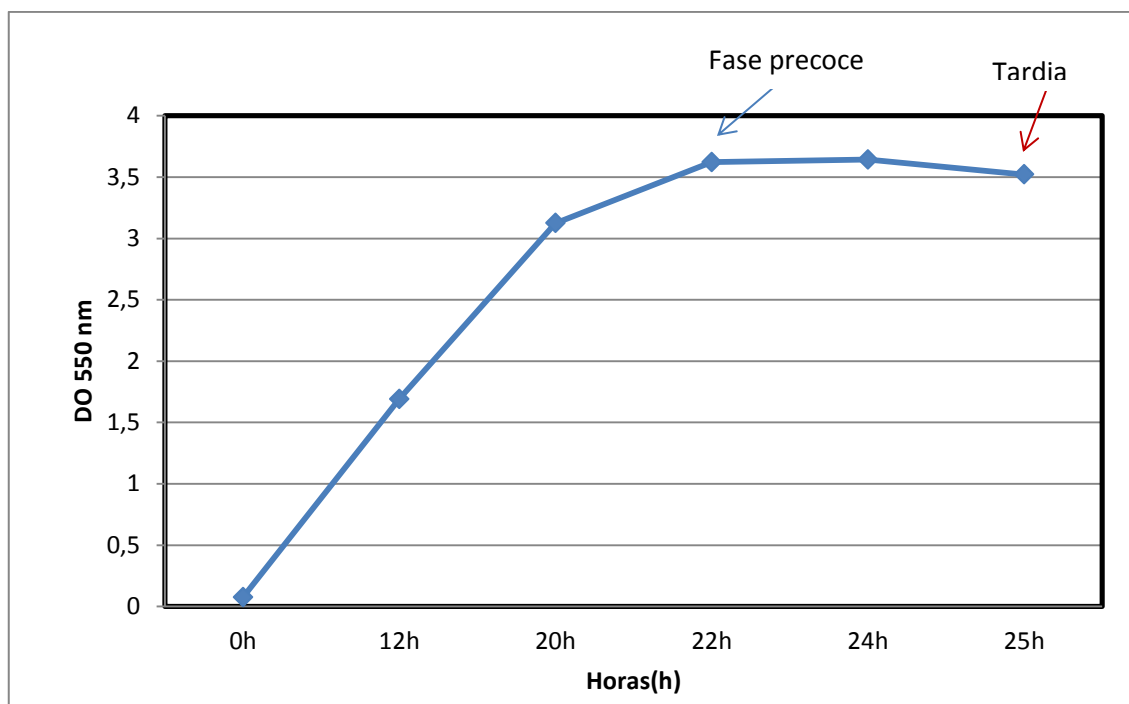


Figura 17 - Exemplo de uma curva de de *Lp* Paris em AYE.

Pode verificar-se que a *Lp* Paris se encontra na fase exponencial aproximadamente até às 21 horas de cultura em AYE, atinge a fase estacionária aproximadamente às 24h e entra em fase de morte celular a partir das 25h.

Ao microscópio óptico (100 X) verificamos, em concordância com diversos estudos publicados, a bactéria passou da forma não móvel (na fase exponencial) para a forma móvel (na fase estacionária). A fase não móvel corresponde à bactéria não virulenta e a fase móvel à fase virulenta, por isso se optou por recolher a *Lp* nesta fase para infectar os monócitos e os macrófagos.

3.5. Infeção em monócitos e macrófagos

Realizou-se os ciclos de infeção com *Lp* Paris testando diversas condições de cultura e utilizando duas linhas celulares primárias (monócitos e macrófagos).

O primeiro ponto a ter em consideração no início de cada ciclo de infeção as células encontram-se em meio RPMI-1640 suplementado com antibióticos, penicilina e

estreptomicina, de modo a prevenir a contaminação com eventuais bactérias provenientes do dador ou do processo de isolamento, no entanto, antes de iniciar o ciclo de infeção é necessário removê-los, substituindo o meio de cultura por RPMI-1640 sem este aditivo. Este cuidado é necessário apesar de esta bactéria ser resistente, porque a presença de antibiótico poderá alterar o processo de infeção nos monócitos e macrófagos.

Numa primeira fase do estudo uma das condições que foi testada foi a utilização de RPMI-1640 com FBS. Para potenciar a fagocitose da *Lp* Paris pelos monócitos e macrófagos alterou-se esta condição passando-se a realizar ciclos de infeção em RPMI-1640 sem FBS, uma vez que sem este componente os monócitos e macrófagos teriam uma maior apetência para fagocitar a *Lp*.

O tempo de contacto entre bactérias e monócitos e macrófagos escolhido foi de 2h a 37°C, para potenciar o contacto entre ambos (Wieland e col., 2006) mas sem centrifugação após a adição das bactérias. Este protocolo revelou ser menos lesivo para as células.

Outra das condições testadas foi o uso de antibiótico (gentamicina) após o período de incubação com a bactéria a fim de remover as bactérias extracelulares, isto é, as que não foram fagocitadas (Wieland e col., 2006, Wieland e col., 2004), realizou-se também ciclo de infeção sem este antibiótico. Nos ciclos de infeção sem a utilização da gentamicina verificou-se a multiplicação das bactérias não fagocitadas pelo que não era possível visualizar o que ocorria dentro dos monócitos e macrófagos.

No final do tempo de incubação, optou-se por efetuar 3 lavagens de modo a diminuir o número de bactérias que não foram fagocitadas, antes da junção da gentamicina.

Com os diferentes protocolos testados (diferentes MOIs e diferentes condições de culturas) os resultados foram similares, isto é, verificou-se pequenas alterações na morfologia das células que tiveram em contato com a *Lp* Paris *versus* o controlo negativo. Na figura 18 observa-se alterações na morfologia dos macrófagos (setas na

figura 18) indiciando que pode ter ocorrido a entrada de *Lp* nestas células. No entanto, para se ter a certeza de que a infeção ocorreu é necessário a quantificação das bactérias que se multiplicaram no interior das células.

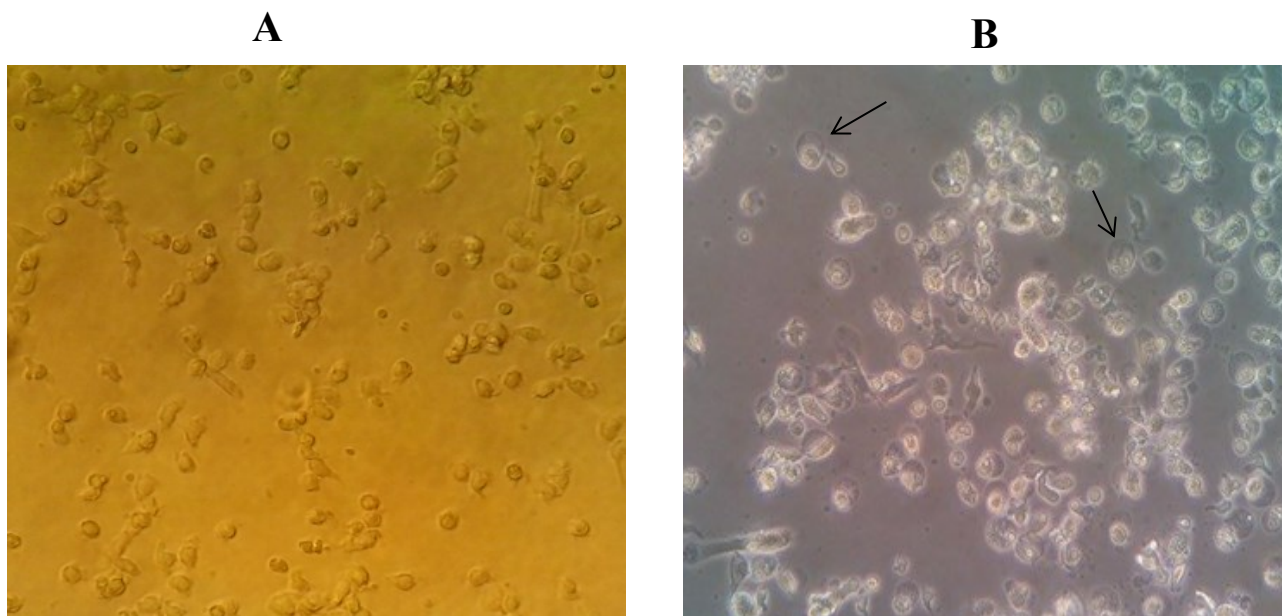


Figura 18 - Morfologia de monócitos humanos em RPMI observada em microscópio invertido(40x).

Macrófagos não infetados (controlo negativo) (A) e macrófagos 48h após infeção com *Lp* (B). As setas indicam a mudança morfológica que ocorreu nos macrófagos.

3.6. Quantificação de bactérias intra e extracelulares

Para quantificar as bactérias foi utilizado o método Miles. No total plaqueou-se um volume de 90 μ l por diluição (30 μ l em triplicado) e observou-se após 5 dias de incubação a 37°C.

Plaqueou-se o sobrenadante e o lisado da monocamada com objectivo de quantificar, respectivamente, as bactérias extracelulares e as que se multiplicaram intracelularmente após o processo infeccioso. Na figura 19, apresenta-se o crescimento obtidos nos ensaios com a linha primária de monocitos, às 24h e 48h após a infeção. As colónias obtidas foram visualizadas à lupa, apresentando o aspeto característico em vidro moído da *Legionella*.

A contagem obtida para as bactérias intracelulares, às 24h, foi superior à obtida para as extracelulares, indiciando que a utilização da gentamicina foi eficaz (tabela 5 e 6).

Comparando os valores das contagens obtidos às 24 e 48h verificou-se que 48 horas após a infeção o número de bactérias foi inferior, isto é, os valores obtidos nas contagens das bactérias intracelulares às 24h foi superior a 10^5 CFU/ml e às 48h foi de 73 CFU/ml. Este resultado pode ter ocorrido porque as bactérias que foram fagocitadas pelos monócitos entraram na via endocítica normal, isto é, foram destruídas pelo fagolisossoma. Outra explicação possível é a de que o valor das 24h estar influenciado pelas bactérias extracelulares, no entanto, os resultados anteriores (os obtidos no sobrenadante) apontam para que esta explicação não seja plausível.

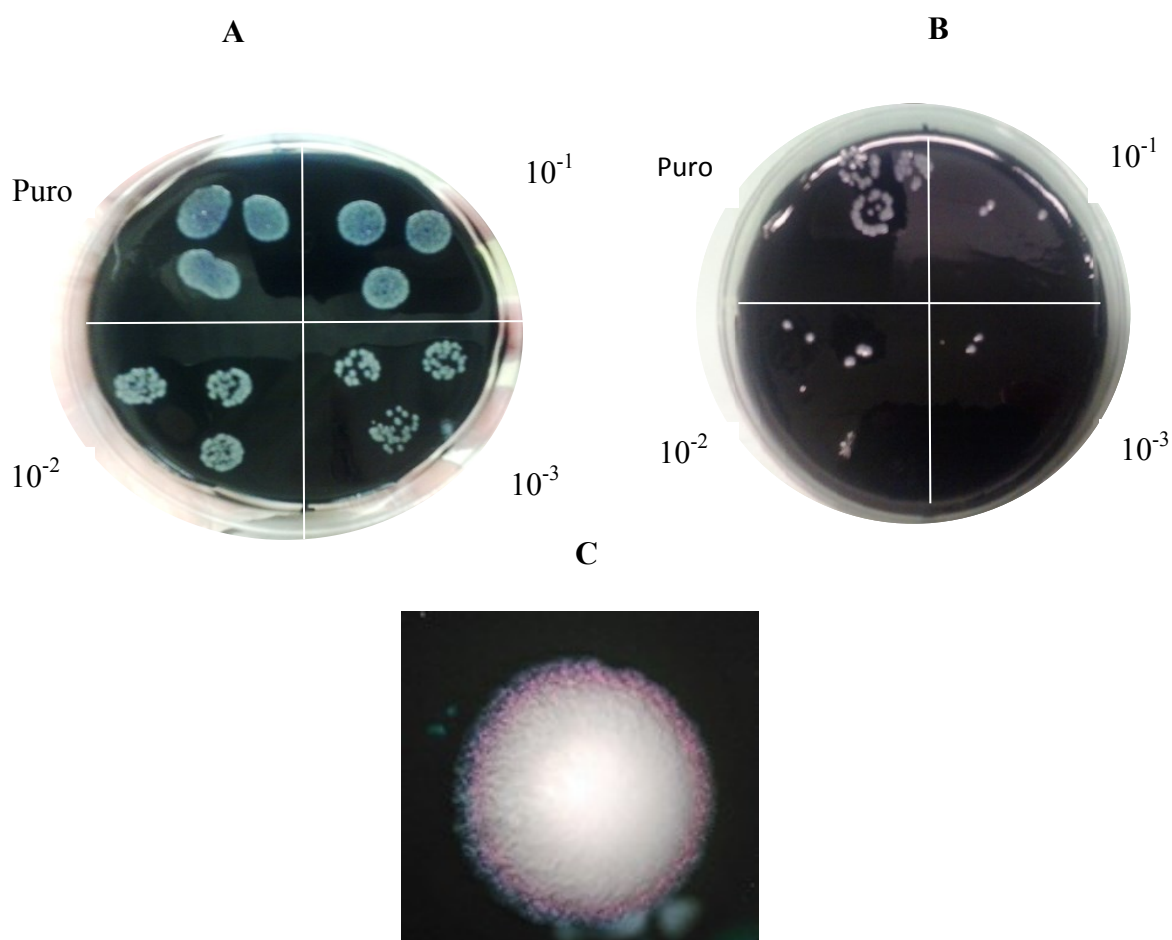


Figure 19 - (A) Plaqueamento de *Lp* às 24h e (B) 48h após infeção da linha primárias de monócitos. (C) Observação de crescimento de colónias de *Lp* Paris em meio BCYE cerca de 5 dias após o plaqueamento. Confirmação à lupa que se tratava de *Legionella*.

Tabela 6 - Contagem de *Lp* Paris (CFU's/ ml) obtidas a partir do monocamada de monócitos após 24h e 48h após infeção (bactérias intracelulares). Resultado de 3 réplicas biológicas.

Horas	Diluição	Nº de colónias observadas	CFU's/ ml
24 H	Puro	Crescimento confluyente	-
	10^{-1}	Crescimento confluyente	-
	10^{-2}	Crescimento confluyente	-
	10^{-3}	>30	$>10^5$
48 H	Puro	22	73
	10^{-1}	1	-
	10^{-2}	3	-
	10^{-3}	1	-

Tabela 7 - Exemplo de uma contagem de *Lp* Paris (CFU's/ml) obtidas a partir do sobrenadante de uma infeção de monócitos (bactérias extracelulares) às 24h e 48h após infeção. Resultado de 3 réplicas biológicas.

Horas	Diluição	Nº de colónias observadas
24 H	Puro	1
	10^{-1}	0
	10^{-2}	0
	10^{-3}	0
48 H	Puro	1
	10^{-1}	0
	10^{-2}	0
	10^{-3}	0

4. Conclusões

A patogénese da bactéria *Legionella* está relacionada com a sua capacidade de sobreviver e multiplicar-se no interior dos macrófagos humanos. O objectivo principal deste trabalho foi estudar a sua replicação em linhas monocíticas primárias, isoladas a partir de PBMC's.

Em diversos estudos, tem sido documentado que a *Lp* para além de se replicar dentro dos macrófagos é citopatogénica para estas células, bem como para monócitos e células epiteliais (Kwaik e col., 1998; Husman e Johnson, 1994; Pearlman e col., 1988).

Neste trabalho, um dos primeiros objectivos foi isolar linhas celulares primárias a partir de sangue periférico de dadores através de gradiente de densidade (Riedhammer e col., 2014; Nazarpour e col., 2012) de modo a posteriormente serem infetadas pela bactéria *Lp* Paris.

Num isolamento de PBMC's por gradiente de ficoll as células isoladas podem ter uma viabilidade até 99% (Nazarpour e col., 2012) pelo que este método de separação é apropriado para a realização do trabalho proposto. Assim, realizaram-se vários isolamentos de sangue periférico de dadores, com diferentes grupos sanguíneos, sexo e idades de modo a obter linhas primárias monocíticas para posterior diferenciação em macrófagos. Conclui-se que no final de cada isolamento os dadores com idades compreendidas entre os 18 e os 35 anos apresentavam valores de PBMC's mais baixos que os restantes dadores, o que pode estar relacionado com a frequência de dádivas anuais nos dadores com idades superiores. O sexo masculino apresentava valores de PBMC's mais elevados que o sexo feminino, o que era previsto, pelo que sempre que foram requisitados os *buffy-coats* ao IPST, solicitava-se preferencialmente dadores do sexo masculino.

Procedeu-se, numa fase inicial, à congelação das PBMC's, tendo-se verificado uma perda de viabilidade e quantidade de PBMC's, o que pode estar associado à toxicidade do DMSO (Riedhammer e col., 2014; Nazarpour e col., 2012).

Como referido anteriormente, a congelação de PBMC's não se revelou eficiente para células humanas primárias, não possibilitando a concretização do desenho de estudo inicialmente proposto, que utilizaria bactérias provenientes de um 1º ciclo de

infeção, testando num segundo ciclo a sua capacidade citotóxica em células diferenciadas a partir do mesmo dador.

Os monócitos circulam em pequena quantidade no sangue periférico, pelo que a obtenção de linhas primárias a partir de *buffy-coats* é um processo complexo.

Da literatura sabe-se que os monócitos que migram para os tecidos se diferenciam em macrófagos na presença de factores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias (Shi e Pamer, 2011). Em diversos estudos têm sido aplicadas várias estratégias, para que seja possível estudar a diferenciação dos macrófagos *in vitro* a partir de linhas celulares monocíticas, de modo a obter um fenótipo de macrófagos altamente diferenciado. O PMA tem sido utilizado para promover a diferenciação de monócitos a macrófagos, em linhas contínuas (Dreskin e col., 2001) e o GM-CSF em linhas primárias. Esta última citocina foi utilizada neste trabalho para diferenciar os monócitos em macrófagos.

A heterogeneidade dos macrófagos é influenciada pelo seu estado de diferenciação (Gordon ., 2007; Geissman e col., 2010) e isso poderá ter influenciado o nosso estudo, pelo que será interessante na continuação do presente trabalho analisar previamente por citometria de fluxo o estado maturacional das células utilizadas para os ciclos de infeção.

Num estudo publicado recentemente, foi testado o papel de uma lectina fúngica (RBL) que estimula a proliferação e secreção de citocinas em PBMC's, tendo sido também avaliado a capacidade que a lectina possui para induzir a diferenciação de monócitos em macrófagos tanto numa linha tumoral como em células primárias. Os autores provaram que a RBL induz a adesão e mudanças morfológicas em monócitos isolados a partir de PBMCs, e ainda apresenta um papel muito importante no aumento da actividade fagocítica dos monócitos, em comparação com outros diferenciadores tais como, PMA e LPS. A diferenciação de monócitos humanos em macrófagos com RBL constitui um modelo *in vitro* de grande potencial (Pujari e col., 2015). O marcador CD54 é um marcador específico da actividade dos macrófagos e foi também demonstrado que as células expostas ao RBL apresentam 99% positividade para este marcador. Uma vez que o estado maturacional e a sua actividade fagocítica são de extrema importância para que estas células possam fagocitar bactérias, teria sido interessante no nosso estudo o uso desta lectina, bem como o uso do referido marcador

por citometria de fluxo para avaliar a actividade das nossas células. Será ainda interessante estudar o processo de fagocitose nas linhas primárias de monócitos e macrófagos.

Outros estudos, referem que o CD14, um marcador dos monocitos, é necessário para actividade fagocítica dos macrófagos (Devitt e col., 1998; Flora e col., 1994; Schlegel e col., 1999).

Dos estudos utilizando bactérias do género *Legionella* e células humanas, a maior parte foi realizada em macrófagos humanos diferenciados a partir de linhas celulares contínuas como TPH1, U937, MM6 cells, HL-60 (Alli e col., 2003; Neumaister e col., 1997; Lawrence e col., 2015), tendo sido demonstrado que esta bactéria replica-se nestas células sendo citopatogénicas para as mesmas. A diferenciação de linhas monocíticas a partir de linhas contínuas é um processo estudado por diversos autores, contrariamente, aos das linhas celulares primárias.

No nosso estudo, verificou-se que os resultados obtidos nos ensaios de infeção realizados utilizando dadores com diferentes tipos sanguíneos, foram similares, o que nos permite concluir que a infeção de células primárias não está dependente do grupo sanguíneo do dador.

No presente trabalho efectuaram-se isolamentos de PBMC's recorrendo a um kit de seleção positiva para a fração CD14⁺ (Silva e col., 2011), comparando os resultados com células obtidas por *panning*, verificando-se que os resultados de infeção pela *Lp* Paris foram similares, não ocorrendo a multiplicação intracelular às 48h.

Após a infeção das duas linhas primárias testadas (monócitos e macrófagos) a análise microscópica da morfologia das células, evidenciou alterações. Este facto, não foi uma consequência do protocolo utilizado porque as referidas alterações foram evidenciadas por comparação entre as células infetadas e não infetadas, mantidas nas mesmas condições (meio e temperatura). Esta observação foi numa primeira fase corroborada pela quantificação das bactérias às 24h, isto é, comparando os valores obtidos no plaqueamento do sobrenadante e do lisado da monocamada estes apontavam para existência de fagocitose. No entanto, ao comparar o crescimento da bactéria às 24h e 48h depois da infeção, verifica-se que não existiu multiplicação intracelular.

Em resumo, no presente trabalho foram concretizados três dos objectivos propostos, não tendo sido possível determinar as taxas de multiplicação intracelular da

Lp Paris e avaliar a eficiência da infeção e a capacidade citotóxica numa linha primária de outro dador.

5. Referências Bibliográficas

- Al-Mufti, R., H. Hambley, F. Farzaneh, and K. H. Nicolaides.** 2004. Assessment of efficacy of cell separation techniques used in the enrichment of foetal erythroblasts from maternal blood: triple density gradient vs. single density gradient. *Clin Lab Haematol* **26**:123-128.
- Alli, O.A., S. Zink, von. Lackum, N.K. Abu, and Y. Kwaik.** 2003. Comparative assessment virulence traits in *Legionella* spp. *Microbiology* **149**:631 e 41.
- Arosa, F. A., E.M, Cardoso, and F. C. Pacheco.** 2007. *Fundamentos de Imunologia*. Lidel, Lisboa –Porto.
- Beaute, J., P. Zucs, and B. de Jong.** 2013. European Legionnaires Disease Surveillance Network. Legionnaires disease in Europe, 2009-2010. *Euro Surveill* **18**:pii_20417.
- Blázquez Garrido, R.M., F.J. Espinosa Parra, L. Alemany Francés, R.M Ramos Guevara, Sánchez-Nieto, J.M., M. Segovia Hernández, Serrano Martínez, J.A, and F. H. Huerta.** 2005. Antimicrobial chemotherapy for Legionnaires' disease: levofloxacin versus macrolides. *Clin Infect Dis* **40**:800–6.
- Blatt, S.P., M.D . Parkinson, E. Pace, P. Hoffman, D. Dolan, P. Lauderdale, R.A Zajac and G.P. Melcher.** 1993. Nosocomial Legionnaires' disease: aspiration as a primary mode of disease acquisition. *Am J Med* **95**:16–22.
- Blyth, C.C., D.N. Adams, and S.C. Chen.** 2009. Diagnostic and typing methods for investigating *Legionella* infection. *N S W Public Health Bull.* **20**:157– 161
- Boshuizen, H.C., S.E. Neppelenbroek, H. van Vliet, J.F. Schellekens, J.W. den Boer and M.F. Peeters.** 2001. Subclinical *Legionella* infection in workers near the source of a large outbreak of legionnaires disease. *J Infect Dis.* **184**: 515 e 8.
- Boshuizen, H.C., J.W Den Boer, H. de Melker, J.F Schellekens, M.F Peeters, and J.A van Vliet.** 2003 Reference values for the SERION classic ELISA for detecting *Legionella pneumophila* antibodies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; **22**:706 e 8.
- Brenner, D.J., A.G. Steigerwalt, and J.E McDade.** 1979. Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family *Legionellaceae*, familia nova. *Ann Intern Med* **90**: 656–658.
- Chow, A., B.D. Brown, and M. Merad.** 2011. Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. *Nat Rev Immunol.* **11**: 788–98.

- Collins, S.J., R.C. Gallo, and R.E. Gallagher.** 1977 Continuous growth and differentiation of human myeloid leukemia cells in suspension culture. *Nature* **270**: 347-349.
- Coetzee, N., H. Duggal, J. Hawker, S. Ibbotson, T.G. Harrison, N. Phin, V. Laza-Stanca, R. Johnston, Z. Iqbal, Y. Rehman, E. Knapper, S. Robinson and N. Aigbogun.** 2012. An outbreak of Legionnaires' disease associated with a display spa pool in retail premises, Stoke-on-Trent, United Kingdom, *Euro Surveill* **17**:pii_20271.
- Cordevant, C., J.S Tang, D. Cleland, and M. Lange.** 2003. Characterization of members of the Legionellaceae family by automated ribotyping. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 34–43.
- Cloud, J.L., K.C. Carroll, P. Pixton, M. Erali, and D.R. Hillyard.** 2000. Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. *J Clin Microbiol* ;**38**: 1709 e 12.
- Correia, A.M., Ferreira, J.S., Borges, V., Nunes, A., Gomes, B., Capucho,R., Gonçalves, J., Antunes, D.M., Almeida, S., Mendes, A., Guerreiro, M., Sampaio, D.A., Vieira, L., Machado, J., Simões, M.J., Gonçalves, P., Gomes J.P.** 2016. Probable Person-to-Person Transmission of Legionnaires' Disease. *N Engl J Med.* ; **374**: 497-8.
- Dahllof, I., H. Baillie and S. Kjellerberg.** 2000. rpoB-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3376–3380.
- Daigneault, M., J.A. Preston, H.M. Marriott, M. K. Whyte, and D.H. Dockrell .** 2010. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS ONE.* **5**:e8668.
- Den, Boer., J.W., and E.P. Yzerman.** 2004. Diagnosis of *Legionella* infection in Legionnaires' disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; **23**: 871 e 8.
- Dennis, P.J., Taylor, J.A., Fitzgeorge, R.B., C.L. Barlett and G.I. Barrow.** 1982. *Legionella pneumophila* in water plumbing systems. *Lancet* **i**: 949–951.
- Desplaces, N., K. Nahapetian, and E. Dournon.** 1984. Urvey of *Legionella* in the Parisian environment. Practical implications. *Presse Med.***13** :1875-9.
- Devitt, A., O.D. Moffatt, C. Raykundalia, J.D Capra, D.L Simmons, and C.D. Gregory.** 1998. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature.* **392**:505–9.
- Diederer, B.M., and M.F. Peeters.** 2007. Evaluation of the SAS *Legionella* Test, a new immunochromatographic assay for the detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine. *Clin Microbiol Inf.* **13**: 86 e 8.

- Diederer, B.M.**, 2008. *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. J. Infect. **56**, 1–12.
- Dreskin, S.C., G.W. Thomas, S.N. Dale and L.E. Heasley.** 2001. Isoforms of Jun kinase are differentially expressed and activated in human monocyte/macrophage (THP-1) cells. J Immunol. **166**:5646–53.
- Edelstein, P.H.** 1981. Improved semi selective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens. J Clin Microbiol **14**: 298–303.
- Engel, M.F., van Manen, L., Hoepelman, A.I, S. Thijsen and J.J. Oosterheert.** 2013. Diagnostic, therapeutic and economic consequences of a positive urinary antigen test for *Legionella* spp. in patients admitted with community- acquired pneumonia: a 7-year retrospective evaluation. J Clin Pathol. **66**:797–802.
- European Centre for Disease Prevention and Control.** 2013. Legionnaires disease in Europe, 2011. ECDC, Stockholm, Sweden.
- Edelstein, P. H.** 1981. Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens. J. Clin. Microbiol. **14**:298–303.
- Edelstein, P.H.** 1993. Legionnaires' disease. Clin Infect Dis. **16**: 741e 9.
- Edelstein P.H.** 2007. Urine antigen tests positive for Pontiac fever: implications for diagnosis and pathogenesis. Clin Infect Dis .**44**:229e31.
- Farhat, M., Moletta-Denat, M., Frere, J., Onillon, S., M.C. Trouilhe Robine E.** 2012. Effects of disinfection on *Legionella* spp., eukarya, and biofilms in a hot water system. Appl Environ Microbiol **78**:6850–6858.
- Fields, B.S., R.F. Benson and R.E. Besser.** 2002. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin. Microbiol. Rev. **15**: 506–526.
- Fields, B.S.** 2005. Procedures for the recovery of *Legionella* from the environment. Respiratory Disease Laboratory Section, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA.
- Fliermans, C.B.** 1996. Ecology of *Legionella*: from data to knowledge with a little wisdom. Microb Ecol. **32**:203–228.
- Fliermans, C.B., W.B. Cherry, L.H. Orrison, S.J Smith, D.L. Tison and D.H Pope.** 1981. Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. Appl Environ Microbiol **41**:9–16.

Flora, P.K. and C.D. Gregory. 1994. Recognition of apoptotic cells by human macrophages: inhibition by a monocyte/macrophage-specific monoclonal antibody. *Eur J Immunol.* **24**: 2625–32.

Fraser, D.W., T.R. Tsai, W. Orenstein, W.E. Parkin, H.J. Beecham, R.G. Sharrar, J. Harris, G.F. Mallison, S.M. Martin, J.E. McDade, C.C. Shepard and P.S. Brachnman. 1977. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med* **297**:1189–1197.

Freshney, R. I. 2010. Cell Separation. In *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, 6th ed., Wiley-Blackwell, New Jersey. pp 227-237.

Fry, N.K., Afshar, B. Bellamy, W. Underwood, A.P., Ratcliff, R.M. Ratcliff Harrison. 2007. Identification of *Legionella* spp. by 19 European reference laboratories: results of the European Working Group for Legionella Infections External Quality Assessment Scheme using DNA sequencing of the macrophage infectivity potentiator gene and dedicated online tools. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**:1119–1124.

Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., Metzgar, R., Aulakh, G., Ting, R., Ruscetti, F., Gallo, F. 1979 .Characterization of the continuous differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* **54**: 713-733

Garrity, G. M., A. Brown and R. M. Vickers. 1980. *Tatlockia* and *Fluoribacter*: two new genera of organisms resembling *Legionella pneumophila*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**:609-614.

Gee, H. 2003. Evolution: ending incongruence. *Nature* **425**, 782.

Geissmann, F., M.G. Manz, S. Jung, M.H. Sieweke, M. Merad, and K. Ley. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* . **327**:656–61.

Glick, T.H., Gregg, M.B., Berman, B., Mallisson, G, W.W. Rhodes and I. Kassanoff. 1978. Pontiac fever: an epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. *Am J Epidemiol.* **107**:149 e 60.

Gordon, S.B., Irving, G.R. Lawson, R.A. Lee, M.E. Lee and R.C Read. 2000. Intracellular trafficking and killing of *Streptococcus pneumoniae* by human alveolar macrophages are influenced by opsonins. *Infect Immun* **68**: 2286–2293.

Gordon, S. 2007. The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol* **37** : Supl.:S9–17.

Harrison, T.G. and A.G Taylor. 1988 The diagnosis of Legionnaires' disease by estimation of antibody levels. In: Harrison TG, Taylor AG, editors. A laboratory manual for *Legionella*. Chichester, England: John Wiley and Sons, Ltd; p. 113 e 35.

Hebert, G. A., C. W. Moss, L. K. McDougal, F. M. Bozeman, and R. M. McKinney, and D. J. Brenner. 1980. The rickettsia-like organisms TATLOCK (1943) and HEBA (1959) bacteria phenotypically similar to but genetically distinct from *Legionella pneumophila* and the WIGA bacterium. *Ann. Intern. Med.* **92**:45–52.

Heuner, K. and M. Swanson. 2008. *Legionella*: molecular microbiology. Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom.

Hicks, L.A., Rose, C.E., Jr, Fields B.S., Drees, M.L., Engel, J.P., Jenkins, P.R., Rouse, B.S., Blythe, D., Khalifah, A.P., D.R. Feikin, C.G. Whitney. 2007. Increased rainfall is associated with increased risk for legionellosis. *Epidemiol Infect* **135**:811–817.

Hilbi, H., G. Segal, and H. A. Shuman. 2001. icm/dot-dependent upregulation of phagocytosis by *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* **42**:603–617.

Hookey, J.V., R.J. Birtles, and N.A. Saunders. 1995. Intergenic 16S rRNA gene (rDNA)-23S rDNA sequence length polymorphisms in members of the family Legionellaceae. *J. Clin. Microbiol.* **33** :2377–2381.

Horwitz, M. A. 1983. The Legionnaires' disease bacterium *Legionella pneumophila* inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J. Exp. Med.* **158**:2108–2126.

Jarraud, S., Descours, G., Ginevra, C., Lina, G, and J. Etienne. 2013. Identification of *Legionella* in clinical samples. *Methods Mol Biol* **954**: 27–56.

Jeffroy, O., H. Brinkmann, F. Delsuc, and H. Philippe. 2006. Phylogenomics: the beginning of incongruence *Trends Genet.* **22**: 225–231.

Jonas, D., Rosenbaum, A., Weyrich, S. Weyrich and S. Bhakdi. 1995. Enzyme-linked immunoassay for detection of PCR-amplified DNA of legionellae in bronchoalveolar fluid. *J Clin Microbiol.* **33**: 1247 e 52.

Kessler, H.H., Reinthaler, F.F., Pschaid, A., Pierer, K., Kleinhapfl, B., E. Eber, and E. Marth. 1993. Rapid detection of *Legionella* species in bronchoalveolar lavage fluids with the EnviroAmp *Legionella* PCR amplification and detection kit. *J Clin Microbiol.* **31**: 3325 e 8.

Koren, H.S., Anderson, S.J., Larrick, J.W. 1979 In vitro activation of a human macrophage like cell line. *Nature* **279**:328-331

Lawrence, A., Eglezos S., Huston, W. 2015. Environmental *Legionella* spp. collected in urban test sites of South East Queensland, Australia, are virulent to human macrophages in vitro. *Res Microbiol.* pii: S0923-2508 15: 00181-3.

Lee, T.C., Vickers, R.M., Yu, V.L., Wagener, M.M. 1993. Growth of 28 *Legionella* species on selective culture media: a comparative study. J Clin Microbiol **31**:2764–2768.

Lo Presti, F., Riffard, S., Meugnier, H., Reyrolle, M., Lasne, Y., Grimont, P.A., Grimont, F., Benson, R.F., Brenner, D.J., Steigerwalt, A.G., Etienne, J., Freney, J. 2001. *Legionella gresilensis* sp. nov. and *Legionella beliardensis* sp. nov., isolated from water in France. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **51**, 1949–1957.

Lowry, P.J., Blankeship, R.J., Gridley, W., Troup, N.J., Tompkins, L.S. 1991 A cluster of *Legionella* sternal-wound infections due to postoperative topical exposure to contaminated tap water. New England Journal of Medicine **324**: 109-103.

Macfarlane, J. T., Miller, A.C., Roderick Smith, W.H., A.H. Morris and D.H. e Rose. 1984. Comparative radiographic features of community acquired Legionnaires' disease, pneumococcal pneumonia, mycoplasma pneumonia, and psittacosis. Thorax **39**:28–33.

Maiwald, M., Helbig J.H., Luck, P.C. 1998 Laboratory methods for the diagnosis of *Legionella* infections. J Microbiol Methods 1998; **33**: 59 e 79.

Malan, A.K., Martins, T.B., Jaskowski, T.D., H.R. Hill, and C.M. Litwin. 2003 Comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays with an immunofluorescence assay for detection of *Legionella pneumophila* types 1 to 6. J Clin Microbiol 2003. **41**: 3060 e 3.

Marques, M.T. 1996. Contribuição para o estudo do género *Legionella* e a sua ocorrência em Portugal (Tese de Doutoramento apresentada na Faculdade de Medicina de Lisboa).

Marston, B.J., H.B. Lipman, and R.F. Breiman. 1994. Surveillance for Legionnaires' disease. Risk factors for morbidity and mortality. Arch Intern Med. **154**:2417–2422.

Mastro, T.D., Fields, B.S., Breiman, R.F., Campbell, J., B.D. Plikaytis, and J.S. Spika. 1991. Nosocomial Legionnaires' disease and use of medication nebulizers. J Infect Dis **163**:667–671.

McDade, J.E., Shepard, C.C., Fraser, D.W., Tsai, T.R., M.A. Redus, and W.R. Dowdle. 1977. Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. N Engl J Med **297**:1197– 1203.

Mercante, J.W, and J. M Winchell. 2015. Current and emerging *Legionella* diagnostics for laboratory and outbreak investigations. Clin Microbiol Rev. **28** : 95-133.

- Miltenyi, S., W. Muller, W. Weichel, and A. Radbruch.** 1990. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* **11**: 231-238.
- Minowada, J., K. Sgawa, M.S. Lok, I. Kubonishi, S. Nakazawa, E. Tatsumi, E. Ohnuma, T., N. Goldblum.** 1980. A model of lymphoid-myeloid cell differentiation based on the study of marker profiles of 50 human leukemia cell lines. In: Serrou B, Rosenfeld C (eds) International Symposium on new trends in human immunology and cancer immunotherapy. Doin editeurs, Paris pp 180-199.
- Misch, E.A., A. Verbon, J.M. Prins, S.J. Skerret, and T.R. Hawn.** 2013. A TLR6 polymorphism is associated with increased risk of Legionnaires' disease. *Genes Immun* **14**:420–426.
- Miyamoto, H., Jitsurong, S., Shiota, R., Maruta, K., Yoshida, S. and E. Yabuuchi** 1997. Molecular determination of infection source of a sporadic *Legionella* pneumonia case associated with a hot spring bath. *Microbiol Immunol* **41**:197–202.
- Molday, R. S. and L.L Molday.** 1984. Separation of cells labeled with immunospecific iron dextran microspheres using. *FEBS Lett* **170**:232-238.
- Molofsky, A.B, and Swanson M.S.** 2004. Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Mol Microbiol* **53**:29–40.
- Monforte, R., R. Estruch, J.Vidal, R. Cervera, and A. Urbano-Marquez.** 1988. Delayed seroconversion in Legionnaires' disease. *Lancet* ; **2**:513.
- Mosser, D.M and J.P Edwards.** 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* **8**:958–69.
- Muder, R.R, and V.L. Yu.** 2002. Infection due to *Legionella* species other than *L. pneumophila*. *Clin. Infect. Dis.* **35**: 990–998.
- Murdoch, D.R., E.J. Walford, L.C . Jennings, Light, G.J., Schousboe, M.I., Cheresky, A.Y, S.T Chambers, and G. I Town.** 1996. Use of the polymerase chain reaction to detect *Legionella* DNA in urine and serum samples from patients with pneumonia. *Clin Infect Dis* .**23**:475 e 80.
- Murdoch, D.R.** 2003. Diagnosis of *Legionella* infection. *Clin Infect Dis.* **36**: 64 e 9.
- Murray, R.G., E., Brenner, D.J., Colwell, R.R., De-vos, P., Goodfellow, M., Grimont, P.A., D., Pfennig, N., E. Stackebrandt, and G.A. Zavarzin.** 1990 Report of the Ad Hoc Committee on approaches to taxonomy within Proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* **40** : 213-215.
- Nazarpour, R., E. Zabihi, E. Alijanpour, Z. Abedian, H. Mehdizadeh, and F. Rahimi.** 2012. Optimization of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) Cryopreservation. *Int J Mol Cell Med.* **1 2** :88-93.

- Neumeister, B., Schoniger, S., Faigle, M. Eichner, and K. Dietz.** 1997. Multiplication of different *Legionella* species in Mono Mac 6 cells and in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* **63**: 1219–1224.
- Newton, H.J., Ang, D.K., L.R. van Driel, and E.I. Hartland.** 2010. Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clin Microbiol Rev.* **23**: 274 e 98.
- Palusinska-Szys, M., and M. Cendrowska-Pinkosz** 2009. Pathogenicity of the family Legionellaceae. *Archivum Immunol Ther Exp.* **57**: 279 e 90.
- Pasculle, A. W., J. C. Feeley, R. J. Gibson, L. G. Cordes, R. L. Myerowitz, C. M. Patton, G. W. Gorman, C. L. Carmack, J. W., and J. N. Dowling.** 1980. Pittsburgh pneumonia agent: direct isolation from human lung tissue. *J. Infect. Dis.* **141**:727–732
- Pearce, M.M., N. Theodoropoulos, M.J Mandel , E. Brown, K.D. Reed and N.P. Cianciotto.** 2012. *Legionella cardiaca* sp. nov., isolated from a case of native valve endocarditis in a human heart. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**:2946–2954.
- Pertoft, H., T.C. Laurent, T. Laas, and L. Kagedal.** 1978. Density gradients prepared from colloidal silica particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll). *Analytical Biochemistry* **88**:271-282.
- Pretlow, T. G, and T.P. Pretlow.** 1989. Cell Separation by Gradient Centrifugation Methods. *Methods in enzymology.* **171**: 462-482.
- Pujari, R., Kumar, N., Ballal, S., Eligar, S.M., Anupama, S., Bhat, G., Swamy B.M., S.R. Inamdar, and P. Shastry.** 2015. Rhizoctonia bataticola lectin (RBL) induces phenotypic and functional characteristics of macrophages in THP-1 cells and human monocytes. *Immunol Lett.* **163** :163-72.
- Ralph, P., Moore, M.A.S, and K. Nilsson.** 1976. Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *J Exp Med.* **143**: 1528-1533
- Rantakokko-Jalava, K, and J. Jalava.** 2001. Development of conventional and real-time PCR assays for detection of *Legionella* DNA in respiratory specimens. *J Clin Microbiol*; **39**: 2904 e 10.
- Ratcliff, R.M., J.A Lanser, P.A Manning, and M.W. Heuzenroeder.** 1998. Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the mip gene. *J Clin Microbiol.* **36**: 1560 e 7.
- Ratcliff, R.M., Lanser, J.A M.W. Heuzenroeder, and P.A Manning.** 2002. Sequenced based genotyping scheme for *Legionella*. In: Reinhard Marre, et al. (Eds.), *Legionella*

- Riedhammer, C., D. Weissert, R.** 2014. Peripheral Blood Mononuclear Cells: Isolation, Freezing, Thawing, and Culture. *Methods Mol Biol.* **1304**:53-61.
- Riffard, S., Lo Presti, F., Normand, P., Forey, F., Reyrolle, M., J. Etienne and F. Vandenesch.** 1998. Species identification of *Legionella* via intergenic 16S-23S ribosomal spacer PCR analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**: 723–730.
- Rogers, J., Dowsett, A.B., Dennis, P.J., J.V. Lee, C.W. Keevil.** 1994. Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1585–1592.
- Rogers, J., A.B. Dowsett, P.J. Dennis, J.V. Lee, and C.W. Keevil.** 1994. Influence of Plumbing Materials on Biofilm Formation and Growth of *Legionella pneumophila* in Potable Water Systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1842–1851.
- Salloum, G., H. Meugnier, M. Reyrolle, F. Grimont, P.A. Grimont, J. Etienne and J. Freney.** 2002. Identification of *Legionella* species by ribotyping and other molecular methods. *Res. Microbiol.* **153** :679–686.
- Sauer, J. D., M. A. Bachman, and M. S. Swanson.** 2005. The phagosomal transporter A couples threonine acquisition to differentiation and replication of *Legionella pneumophila* in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 9924–9929.
- Schlegel, R.A., S. Krahling, M.K. Callahan, and P. Williamson.** 1999. CD14 is a component of multiple recognition systems used by macrophages to phagocytose apoptotic lymphocytes. *Cell Death Differ.* **6**:583–92.
- Sheehan, K.B., J.M. Henson, and M.J. Ferris.** 2005. *Legionella* species diversity in an acidic biofilm community in Yellowstone National Park. *Appl Environ Microbiol* **71**:507–511.
- Silva, Z., Z. Tong, Z. Cabral M.G. Martins, C., Castro, R., Reis, C., Trindade, H., K. Konstantopoulos, P.A. Videira.** 2011. Sialyl Lewisx-dependent binding of human monocyte-derived dendritic cells to selectins. *Biochem Biophys Res Commun.* **409**:459-64.
- Shin, S., C. L. Case, K. A. Archer, C. V. Nogueira, K. S. Kobayashi, R. A. Flavell, C. R. Roy, and D. S. Zamboni.** 2008. Type IV secretion-dependent activation of host MAP kinases induces an increased proinflammatory cytokine response to *Legionella pneumophila*. *PLoS Pathog.* **4**: e1000220.
- Shi, C., and E.G. Pamer.** 2011. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* **11**:762–74.

- Sykes, J. A., J. Whitescarver, L. Briggs, and J.H. Anson.** 1970. Separation of tumor cells from fibroblasts with use of discontinuous density gradients. *J Natl Cancer Inst* **44**:855-864.
- Sopena, N., Sabria, M., Pedro-Botet, M.L., Reynaga, E., Garcia-Nunez, M., Dominguez, J., Matas, L.** 2002. Factors related to persistence of *Legionella* urinary antigen excretion in patients with Legionnaires' disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **21**:845-848.
- Steele, T.W., J. Lanser, and N. Sanger.** 1990. Isolation of *Legionella longbeachae* serogroup 1 from potting mixes. *Appl Environ Microbiol* **56**: 49-53.
- Steinert, M., Hagele, S., Skrivwan, C., Grimm, D., Fajardo, M., Heuner, K., Schleicher, M., Hentschel, U., Ludwig, W., Marre, R. and J. Hacker.** 2002. Interaction of *Legionella pneumophila* com Dictyostelium discoideum. In: *Legionella ^ Proceedings of the Fifth International Symposium* (Marre, R., Abu Kwaik, Y., Bartlett, C., Cianciotto, N., Fields, B.S., Frosch, M., Hacker, J. and Luck, P.C., Eds.), American Society for Microbiology Press, Washington, DC. pp. 161-164
- Stolhaug, A., and K. Bergh.** 2006. Identification and differentiation of *Legionella pneumophila* and *Legionella* spp. with realtime PCR targeting the 16S rRNA gene and species identification by mip sequencing. *Appl Environ Microbiol.* **72**: 6394 e 8.
- Stout, J.E., and V.L Yu.** 1997. Legionellosis. *N Engl J Med* **337**:682-687.
- Straus, W.L., Plouffe, J.F., File, T.M., Jr Lipman, H.B., Hackman, B.H., Salstrom, S.J, Benson, R.F., Breiman, R.F.,** 1996. Risk factors for domestic acquisition of Legionnaires disease. Ohio Legionnaires Disease Group. *Arch Intern Med* **156**:1685-1692.
- Sturgill-Koszycki, S., and M. S. Swanson.** 2000. *Legionella pneumophila* replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. *J. Exp. Med.* **192**:1261-1272.
- Sundström, C., and K. Nilsson.** 1976. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* **17**:565-577.
- Templeton, K.E., Scheltinga, S.A., Sillekens, P., Crielaard, J.W., van Dam, A.P., H. Goossens, and E.C. Claas.** 2003. Development and clinical evaluation of an internally controlled, single-tube multiplex realtime PCR assay for detection of *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species. *J Clin Microbiol.* **41**: 4016 e 21.
- Tilney, L. G., O. S. Harb, P. S. Connelly, C. G. Robinson, and C. R. Roy.** 2001. How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. *J. Cell Sci.* **114**:4637-4650.

Tomlinson, M. J., S. Tomlinson, X.B. Yang, and J. Kirkham. 2012. Cell separation: Terminology and practical considerations. *J Tissue Eng* **4**: 2041731412472690.

Tossa, P., M. Deloge-Abarkan, D. Zmirou-Navier, P. Hartemann, and L. Mathieu. 2006 Pontiac fever: an operational definition for epidemiological studies. *BMC Public Health*. **6**:112.

Tsai, T.F., D.R. Finn, B.D. Plikaytis, W. McCauley, S.M. Martin, and D.W. Fraser. 1979. Legionnaires' disease: clinical features of the epidemic in Philadelphia. *Ann. Intern. Med.* **90** : 509–517.

Viasus, D., S. Di Yacovo, C. Garcia-Vidal, R. Verdaguer, F. Manresa, J. Dorca, F. Gudiol, and J. Carratala. 2013. Community-acquired *Legionella pneumophila* pneumonia: a single-center experience with 214 hospitalized sporadic cases over 15 years. *Medicine (Baltimore)* **92(1)**:51–60.

Wieland, H., F. Goetz, and B. Neumaister. 2004. Phagosomal acidification is not a prerequisite for intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in human monocytes. *J Infect Dis.* **189**:1610-4.

Wieland, H., N. Hechtel, M. Faigle, and B. Neumeister. 2006. Efficient intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in human monocytes requires functional host cell L-type calcium channels. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **47** : 296-301.

Williams, A., and M.S. Lever. 1995 Characterisation of *Legionella pneumophila* antigen in urine of guinea pigs and humans with Legionnaires' disease. *J Infect.* **30**:13 e 6.

Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**: 221–271

Zech, L., U. Haglund, K. Nilsson, and G. Klein. 1976. Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. *Int J Cancer* **17**:47-56.

Anexo I

Colheita de sangue e manuseio do processo pelo Instituto Português do Sangue e da Transplantação (IPST)

Para esta tese foi necessária a utilização de produtos derivados de sangue adquiridos a partir de sangue de doadores voluntários saudáveis fornecidos e eticamente aprovados pelo Instituto Português do Sangue e da Transplantação (IPST).

Foram recolhidos aproximadamente 450-500 ml de sangue de um doador para um saco adequado que contém 63 ml de fosfato de citrato de dextrose (CPD), uma solução anticoagulante que preserva o sangue.

É efetuado um controlo serológico para: Ac anti- *treponema pallidum*, Ag-HBs, Anti-HBc, anti-HCV, anti-HIV 1/2, THIV/HCV/HBV os quais devem ser negativos.

Devido à duração deste processo, só é possível adquirir o o *buffy-coat* no dia seguinte, sendo que cada *buffy-coat* fornecido para fins de investigação contém cerca de 60 ml de sangue.

Cada *buffy-coat* é fornecido com informações, tais como o tipo sanguíneo, a data da colheita, data de validade, os resultados do controlo serológico e tipo de sangue do doador, sendo que o sexo e idade do doador podem também ser incluídos (Figura 1).



Figura 1-Etiqueta de um saco de sangue. Cada etiqueta contém informações sobre o conteúdo de sangue do saco, tais como: data de recolha de sangue, data de validade, os resultados do controlo serológico tipo de sangue do doador e, eventualmente, o seu sexo e idade.

Anexo II

Cultura de *Lp* Paris em meio BCYE- α

Preparação do meio BCYE- α (100ml):

- Pesar 2,77g de *Legionella* CYE agar base (Oxoid);
- Adicionar 100 ml de água destilada;
- Ferver;
- Autoclavar (Heraeus - Kendro) a 120°C durante 20 minutos;
Deixar arrefecer até atingir a temperatura de 60°C;
Adicionar o suplemento *Legionella* BCYE growth (Oxoid) e agitar;
- Distribuir por cada placa de *Petri* (90 mm de diâmetro), 20 ml de meio em câmara de fluxo laminar Classe II (Nuair);
- Guardar a 2 a 8°C.
- Para testar a esterilidade, colocar uma placa na estufa a 37°C (Mettler) durante 48 horas. Observar a ausência ou presença de crescimento.

Anexo III

Meio de extracto de levedura tamponado com ACES (AYE)

1. Pesar na balança analítica (Kern EG):
 - 0,125g de pirofosfato de ferro (Sigma);
 - 5g de ACES (Applichem);
 - 5g de Extracto de levedura (BiokarDiagnostics);
 - 0,2g de L-cysteina (Applichem);
2. Dissolver a quente e com agitação (Bunsen) o pirofosfato de ferro em 50 ml de água destilada (deixar arrefecer);
3. Dissolver com agitação o ACES e o extracto de levedura em 450ml de água destilada;
4. Acertar a pH= 6,9 (pH Meter – Metrhm);
5. Adicionar à mistura do ponto 3, a L-cysteina e a solução de pirofosfato de ferro preparada previamente no ponto 2;
6. Esterilizar o meio com filtro de 0,22 μ m na câmara de fluxo laminar Classe II (Nuaire).

Anexo IV

Meios utilizados no processo de adesão e Infeção	
PBS (tampão fosfato 1X)	Solução com 1.47 mM KH_2PO_4 , 4.29 mM $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 137 mM NaCl e 2.68 mM KCL (pH=7.3) em água destilada
Meio de cultura utilizado para lavagens/ infeção (remover <i>Legionella</i> extracelulares durante infeção)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pesar 15,5 g de RPMI 2. Adicionar 1000 ml de água destilada num Erlenmeyer de 1 L 3. Filtrar através de sistema de filtração.
Meio de cultura utilizado (RPMI completo) (cultura e infeção)	RPMI-1640 suplementado com 20% (v/v) FBS, 2 mM de L-Glutamina, 100ug de penicilina/estreptomicina, 1% (v/v) de aminoácidos não essenciais e 1% (v/v) de piruvato de sódio. Para infeção Meio sem Estreptomicina
Meio de congelação	Meio RPMI-1640 suplmentado com 10% DMSO + 90% de FCS

Anexo V**Planeamento de Tarefas para infeção de macrófagos(a partir de PBMC's congelados)**

	Isolamento	Adesão	Infeção
Dia 0	Separação de PBMC's e congelação		
Dia 1 (a descongelação de PBMC's nem sempre foi realizada no dia seguinte ao isolamento)		Descongelar PBMC' de modo a colocar em cultura para posterior adesão à placa	Descongelar <i>Lp</i> Paris , plaqueando em meio BCYE
Dia 2			
Dia 3			Passagem de <i>Lp</i> Paris para Meio BCYE novamente. Efetuar mudança de meio RPMI de células
Dia 4			
Dia 5			Mudar o meio das células (RPMI completo) e preparar Meio AYE para infeção
Dia 6			Colocar <i>Legionella</i> em cultura líquida por volta das 19h e preparar solução gentamicina. Preparar o meio RPMI completo sem estreptomicina para infeção
Dia 7			As 12h iniciar a leitura de absorvâncias. Mudança de Meio RPMI completo para meio sem antibiótico. Quando a <i>Lp</i> Paris estiver na fase estacionária realizar protocolo de infeção.

